

Aus dem Bereich  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
Fachrichtung Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Einfluss der HSP100/Clp ATPasen ClpB und ClpC aus  
*Staphylococcus aureus* auf die Internalisierung und  
das Langzeitüberleben in eukaryoten Zellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2013

vorgelegt von: Dipl.-Biol. Melanie Finke  
geb. am: 15.10.1983 in Heilbronn/Neckargartach



Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur im Zeitraum von Oktober 2009 bis Dezember 2012 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Mathias Herrmann im Fachbereich medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes, Standort Uniklinik Homburg, angefertigt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Das Bakterium <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
1.2 Syntheseregulation von Virulenzfaktoren.....	5
1.2.1 Der <i>agr</i> -Lokus.....	6
1.2.2 Der <i>sae</i> -Lokus.....	6
1.2.3 Der <i>sarA</i> -Lokus.....	7
1.2.4 Der alternative Sigma-Faktor $\sigma^B$ .....	7
1.3 Persistierende Infektionen durch <i>S. aureus</i> .....	8
1.3.1 Biofilmbildung durch <i>S. aureus</i> .....	8
1.3.2 Zelluläre Invasion durch <i>S. aureus</i> und post-invasive Ereignisse.....	9
1.4 Hitze-Schock Antwort.....	12
1.4.1 HSP100/Clp ATPasen und Clp proteolytische Komplexe.....	13
1.4.2 Die HSP100/Clp ATPasen ClpB und ClpC.....	16
1.4.3 Die Rolle der HSP100/Clp ATPase ClpC im oxidativen Metabolismus von <i>S. aureus</i> .....	17
1.5 Zielsetzungen dieser Arbeit.....	20
<b>2 Material</b> .....	<b>21</b>
2.1 Bakterienstämme und eukaryote Zelllinien.....	21
2.2 Plasmide.....	23
2.3 Oligonukleotide.....	24
2.4 Antibiotika.....	26
2.5 Nährmedien.....	27
2.6 Puffer.....	28
2.7 Enzyme.....	28



---

<b>2.8 Zentrifugen.....</b>	<b>29</b>
<b>2.9 Sonstige Geräte.....</b>	<b>29</b>
<b>2.10 Bezugsquellen.....</b>	<b>30</b>
2.10.1 Verwendete Standards und Kits.....	30
2.10.2 Chemikalien.....	30
2.10.3 Verwendete Einmal-Plastikwaren.....	31
<b>2.11 Computerprogramme und Datenbanken.....</b>	<b>31</b>
 <b>3 Methoden.....</b>	 <b>32</b>
<b>3.1 Kultivierung und Konservierung der verwendeten Bakterienstämme     und eukaryoten Zelllinien.....</b>	 <b>32</b>
3.1.1 Anzuchtbedingungen und Konservierung von <i>S. aureus</i> und <i>E. coli</i> .....	32
3.1.2 Auftauen, Kulturbedingungen, Passagierung und Konservierung eukaryoter Zellen.....	32
<b>3.2 Isolierung, Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren.....</b>	<b>34</b>
3.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. aureus</i> .....	34
3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. aureus</i> und <i>E. coli</i> .....	35
3.2.3 Isolierung, DNase-Verdau und Reinigung von Gesamt-RNA.....	35
3.2.3.1 Isolierung, DNase-Verdau und Reinigung von Gesamt-RNA aus in Kultur angezogenen <i>S. aureus</i> .....	36
3.2.3.2 Isolierung, DNase-Verdau und Reinigung von Gesamt-RNA aus in EA.hy926 intrazellulär lokalisierten <i>S. aureus</i> .....	36
<b>3.3 Ethanolpräzipitation.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4 Agarose-Gelelektrophorese.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</b>	<b>38</b>
3.5.1 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	38
<b>3.6 Sequenzierung.....</b>	<b>38</b>
<b>3.7 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation.....</b>	<b>39</b>
3.7.1 Restriktion.....	39
3.7.2 Dephosphorylierung.....	39
3.7.3 Ligation.....	40
<b>3.8 Reverse Transkription von Gesamt-RNA.....</b>	<b>40</b>

---

<b>3.9</b>	<b>Quantitative Real-Time PCR.....</b>	<b>40</b>
<b>3.10</b>	<b>Transformation.....</b>	<b>42</b>
3.10.1	Präparation kompetenter Zellen und Transformation von <i>E.coli</i> .....	42
3.10.1.1	Präparation kompetenter Zellen von <i>E. coli</i> .....	42
3.10.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	43
3.10.2	Präparation elektrokompeter Zellen und Elektroporation von <i>S. aureus</i> .....	44
3.10.2.1	Präparation elektrokompeter Zellen von <i>S. aureus</i> .....	44
3.10.2.2	Elektroporation von <i>S. aureus</i> .....	45
<b>3.11</b>	<b>Phagentransduktion.....</b>	<b>45</b>
<b>3.12</b>	<b>Konstruktion verschiedener <i>clp</i>-Mutanten und Komplementation</b>	
	der <i>clpB</i> - und <i>clpC</i> - Insertionsmutanten.....	<b>46</b>
3.12.1	Konstruktion von <i>clp</i> -Deletionsmutanten.....	46
3.12.2	Konstruktion der <i>clpB</i> -Insertionsmutante.....	50
3.12.3	Erzeugung weiterer <i>clpC</i> -Insertionsmutanten mittels Phagentransduktion.....	51
3.12.4	Komplementation der <i>clpB</i> - und <i>clpC</i> -Insertionsmutanten.....	51
<b>3.13</b>	<b>Langzeitwachstum und Bestimmung der Lebendkeimzahl.....</b>	<b>53</b>
<b>3.14</b>	<b>Aconitase (CitB)-Aktivitätsbestimmung.....</b>	<b>54</b>
3.14.1	Aconitase-Assay.....	54
3.14.2	Modifiziertes Lowry Protein Assay.....	55
<b>3.15</b>	<b>Untersuchung der Biofilmbildung.....</b>	<b>55</b>
3.15.1	Biofilmbildung in 24-well Schalen.....	55
3.15.2	Biofilmbildung in 96-well Schalen.....	56
<b>3.16</b>	<b>Internalisierung-Assay und Assay zur intrazellulären Persistenz.....</b>	<b>56</b>
<b>3.17</b>	<b>Test auf <math>\alpha</math>-Hämolysin Aktivität.....</b>	<b>58</b>
<b>3.18</b>	<b>Apoptose- und Nekrose-Assay.....</b>	<b>58</b>
<b>3.19</b>	<b>Maus-Abszess-Modell.....</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Verifizierung des Einflusses von ClpB auf das <i>in vitro</i> Langzeitüberleben von</b>	
	<i>S. aureus</i> DSM20231.....	<b>61</b>
4.1.1	Untersuchung der Transkription von <i>clpB</i> in <i>S. aureus</i> DSM20231	
	nach <i>clpC</i> Inaktivierung.....	61

---

4.1.2 Bestimmung der Aconitaseaktivität in <i>S. aureus</i> DSM20231 <i>clpB</i> und DSM20231 <i>clpC</i> .....	62
4.1.3 Bestimmung des Langzeitwachstum und der Lebendkeimzahl von <i>S. aureus</i> DSM20231 <i>clpB</i> sowie DSM20231 <i>clpC</i> .....	64
<b>4.2 Mol-Bestimmung für DSM20231, LS1, Newman T.F. und SH1000.....</b>	<b>67</b>
<b>4.3 Überprüfung der Internalisierung sowie des intrazellulären</b> Langzeitüberleben von DSM20231 <i>clpB</i> und DSM20231 <i>clpC</i> .....	<b>68</b>
4.3.1 Internalisierung-Assay mit DSM20231 <i>clpB</i> und DSM20231 <i>clpC</i> .....	68
4.3.2 Untersuchung der intrazellulären Persistenz von DSM20231 <i>clpB</i> und DSM20231 <i>clpC</i> .....	69
<b>4.4 Einfluss der <i>clpC</i> Inaktivierung auf das Langzeitüberleben <i>in vitro</i> und im Zellkulturmodell von weiteren <i>S. aureus</i> Stämmen.....</b>	<b>70</b>
4.4.1 Bestimmung des Langzeitwachstum und der Lebendkeimzahl von <i>S. aureus</i> LS1 <i>clpC</i> , Newman T.F. <i>clpC</i> sowie SH1000 <i>clpC</i> .....	70
4.4.2 Internalisierung-Assay mit LS1, Newman T.F. und SH1000 sowie den jeweiligen <i>clpC</i> -Mutanten.....	74
4.4.3 Untersuchung der intrazellulären Persistenz von LS1, Newman T.F. und SH1000 sowie den jeweiligen <i>clpC</i> -Mutanten.....	75
<b>4.5 Untersuchung zur <i>in vivo</i> Überlebensfähigkeit von Newman T.F. <i>clpC</i>.....</b>	<b>76</b>
<b>4.6 Untersuchungen zur Biofilmbildung von DSM20231 <i>clpB</i> und DSM20231 <i>clpC</i>.....</b>	<b>78</b>
<b>4.7 Untersuchung möglicher Ursachen für die intrazelluläre Persistenz von DSM20231 <i>clpC</i>.....</b>	<b>79</b>
4.7.1 Einfluss der <i>clpC</i> Inaktivierung in DSM20231 auf die Apoptose.....	80
4.7.1.1 Einfluss der <i>clpC</i> Inaktivierung auf die $\alpha$ -Hämolysin Aktivität von DSM20231.....	82
4.7.2 Einfluss der <i>clpC</i> Inaktivierung in DSM20231 auf den bakteriellen Zelltod über das MazEF Toxin-Antitoxin System.....	83
4.7.2.1 Bestimmung des Langzeitwachstum und der Lebendkeimzahl.....	84
4.7.2.2 Internalisierung-Assay mit DSM20231 sowie den Einzel- und Doppelmutanten von <i>clpC</i> , <i>mazEF</i> und <i>sigB</i> .....	87
4.7.2.3 Untersuchung der intrazellulären Persistenz von DSM20231 sowie den Einzel- und Doppelmutanten von <i>clpC</i> , <i>mazEF</i> und <i>sigB</i> .....	88

---

4.7.3 Untersuchung zur mRNA Transkription von intrazellulär persistierenden <i>S. aureus</i> DSM20231 und DSM20231 <i>clpC</i> Zellen.....	90
<b>4.8 Herstellung weiterer <i>clp</i>-Mutanten im <i>S. aureus</i> Stamm DSM20231.....</b>	<b>96</b>
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>97</b>
<b>5.1 Ausblick.....</b>	<b>117</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>119</b>
<b>Kongressbeiträge/Posterpräsentationen.....</b>	<b>140</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>141</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>142</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

A <sub>240</sub>	Absorption bei 240 nm
Abb.	Abbildung
ABB	Annexin-Bindepuffer
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
ad	<i>adde</i> (auffüllen bis)
Agr	Accessory gene regulator
AIP	autoinduzierendes Peptid
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenzmarker
ArISR	Autolysis-related locus
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
Bap	Biofilm associated protein
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
Chap.	Chapter
CitB	Aconitase
ClfAB	Clumping factors AB
Clp	caseinolytic protein (caseinolytisches Protein)
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CtsR	Class three stress gene repressor
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid

---

DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
Eap	Extracellular adherence protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
Erm <sup>R</sup>	Erythromycin-Resistenzmarker
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
Fn	Fibronektin
FnBPAB	Fibronektin- Bindeprotein AB
g	Einheit: Gramm; Gravitationskonstante
GISA	Glykopeptid-intermediäre <i>Staphylococcus aureus</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>mill</sub>	hochreines Millipore-Wasser
HsIVU	Heat Shock Locus VU
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSP's	Heat Shock Proteins (Hitze-Schock Proteine)
Ica	intercellular adhesion
IgG	Immunglobulin G
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenzmarker
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
KBE	Koloniebildende Einheit
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
knt	Kilonukleotide
kV	Kilovolt

---

I	Liter
LB	Luria Bertani
McF	McFarland
MHI	Müller-Hinton
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mol	Multiplicity of Infection
MRSA	methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
NaCl	Natriumchlorid
neg.	negativ
ng	Nanogram
nm	Nanomolar
n.s.	nicht signifikant
OD <sub>240</sub> , OD <sub>530</sub> , OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 240, 530, bzw. 600 nm
ORF	open reading frame
PBS	Phosphat Buffered Saline
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
PIA	Polysaccharid interzellulär Adhäsion
PMN	Polymorphonuklearen Leukozyten
pmol	pikomolar
pos.	positive
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur; Real-Time
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
S.	<i>Staphylococcus</i>

---

Sar	Staphylococcal accessory regulator
SCV's	Small Colony Variants
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sea	<i>S. aureus</i> exoprotein expression
sec.	Sekunde
srr	Staphylococcal respiratory response
syn.	Synonym
Std.	Stunde(n)
TA	Teichoic Acids
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
T/E	Trypsin-EDTA
Thy-SCV	Thymidin-abhängige Small Colony Variant
Tet <sup>R</sup>	Tetracyclin-Resistenzmarker
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
üNK	über Nachtkultur
v.a.	vor allem
VISA	Vancomycin-intermediäre <i>Staphylococcus aureus</i>
vWF	von Willebrand-Faktor
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
α	alpha
β	beta
σ <sup>A</sup>	Sigma-Faktor A
σ <sup>B</sup>	Sigma-Faktor B
μF	Mykrofarad
μg	Mykrogramm



$\mu\text{l}$	Mykroliter
$\mu\text{m}$	Mykrometer
$\Phi$	Phi
$\Delta$	delta
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

## Zusammenfassung

Das opportunistische Pathogen *Staphylococcus aureus* ist bekannt dafür, eine Vielzahl von Infektionen verursachen zu können. Dabei kann es sich neben beispielsweise Blutvergiftungen auch um persistierende Erkrankungen, wie chronische Osteomyelitiden, Biofilmbildungen auf Implantaten oder chronisch rezidivierende Bronchitiden handeln [von Eiff *et al.*, 1997a; Kazemzadeh-Narbat *et al.*, 2013; Lobo & Mulloy, 2012; Sadowska *et al.*, 2002]. Eine Ursache für diese chronischen bzw. immer wiederkehrenden Erkrankungen sind oftmals intrazellulär persistierende *S. aureus*. Diese Persister sind innerhalb der eukaryoten Wirtszelle weitestgehend geschützt vor einer antimikrobiellen Therapie, ungünstigen Umgebungsbedingungen und der Immunabwehr des Wirts. Eine Inaktivierung der zu der Hitze Schock Protein- (HSP-) Familie 100 zählenden Clp ATPase ClpC führt *in vitro* zu einem signifikant verbessertes Langzeitüberleben des *S. aureus* Isolats DSM20231 [Chatterjee *et al.*, 2005; diese Arbeit]. Darauf basierend konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis einer erhöhten intrazellulären Langzeitpersistenz dieser DSM20231 *clpC*-Mutante innerhalb der endo- und epithelialen Zelllinien EA.hy926 bzw. HaCaT erbracht werden. Die Beständigkeit, mit der sich ein Fehlen von ClpC positiv auf das intrazelluläre Langzeitüberleben in beiden eukaryoten Zelltypen auswirkte, konnte durch Zellkulturexperimente mit weiteren genetisch nicht nahe miteinander verwandter *S. aureus* Isolate wie LS1, Newman T.F. und SH1000 verdeutlicht werden. Zudem konnte *in vivo* anhand eines Maus-Abszess-Modells 4 Tage nach Infektion eine deutlich erhöhte Menge an Bakterienzellen der Newman T.F. *clpC*-Mutante in der Leber nachgewiesen werden. Aufgrund vorangegangener Studien, in denen bei *S. aureus* Zellen ohne funktionalem *clpC* eine erhöhte Menge an ClpB beobachtet wurde [Frees *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2010], wurde zudem die Rolle von ClpB im Langzeitüberleben von *S. aureus* DSM20231 untersucht. Hier konnte ein, wenn auch im Vergleich zu ClpC, geringerer Effekt auf das *in vitro* Überleben identifiziert werden. Eine Rolle beider Clp ATPasen, ClpB und ClpC, auf die Invasivität von *S. aureus* wurde dabei nicht identifiziert. Als mögliche Ursachen für die erhöhte intrazelluläre Persistenz nach *clpC* Inaktivierung konnte ein Effekt auf die Apoptose der eukaryoten Zellen ausgeschlossen werden. Ebenso konnten keine klaren Hinweise dafür gefunden werden, dass das Toxin-Antitoxin System MazEF aus *S. aureus*, welches in den programmierten Zelltod der Bakterien involviert ist und von dem bekannt ist, dass es in seiner Aktivität von ClpC beeinflusst wird [Donegan *et al.*, 2010], für

den *clpC* Effekt auf das *in vitro* und *in vivo* Langzeitüberleben von Bedeutung ist. Anhand von Transkriptionsanalysen konnte zudem gezeigt werden, dass das Fehlen von *clpC* in intrazellulär persistierenden *S. aureus* Zellen zu einer Reduktion der mRNA Transkription von Regulatorgenen wie *sarA* und *RNAIII* sowie des für  $\alpha$ -Toxin kodierenden Gens *hla* führt. Die Transkription des für Protein A kodierenden Gens *spa* in der *clpC*-Mutante ist dabei erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass ClpC die Expression von Exotoxinen unter *in vivo* Bedingungen positiv beeinflusst.

## Summary

The opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* is a known cause for several diseases such as septicemia, and may cause persistent infections like chronic osteomyelitis, implant associated biofilm formation, and chronic pulmonary disease [von Eiff *et al.*, 1997a; Kazemzadeh-Narbat *et al.*, 2013; Lobo & Mulloy, 2012; Sadowska *et al.*, 2002]. Such chronic and relapsing infections are thought to be due to intracellular persisting *S. aureus* cells, which are, largely protected from antimicrobial treatment, unfavorable environmental conditions, and from the host's immune system within the eukaryotic host cell. Inactivation of the HSP100 (Heat Shock Protein 100) Clp ATPase ClpC of the *S. aureus* Isolat DSM20231 is known to improve the *in vitro* long-term survival capacity of the bacterial cell [Chatterjee *et al.*, 2005; own work]. Based on these findings, the impact of ClpC on the intracellular survival of DSM20231 cells within human endothelial- and epithelial cell lines (EA.hy926 and HaCaT, respectively) was determined. These studies identified a significantly enhanced intracellular long-term persistence capacity of DSM20231 *clpC*-mutant cells in both human cell lines, and this phenotype could be confirmed with other genetically unrelated *S. aureus* isolates such as LS1, Newman T.F. and SH1000, which all showed an augmented intracellular survival within HaCaT cells upon *clpC* inactivation. By using a murine abscess model, an increased amount of Newman T.F. *clpC* cells could be found in liver tissues 4 days post-infection, suggesting that a functional ClpC might attenuate virulence or the persistence capacity of *S. aureus* within this tissue. Since previous studies indicated an increased production of ClpB in *S. aureus* cells missing a functional ClpC [Frees *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2010], the impact of a *clpB* mutation in *S. aureus* DSM20231 on long-term survival was also analyzed. In contrast to *clpC* inactivation, missing of a functional ClpB in DSM20231 affected the *in vitro* survival of *S. aureus* in a minor extent. Moreover, neither the insertional inactivation of *clpB* nor the inactivation of *clpC* in DSM20231 affected the invasiveness of *S. aureus* into eukaryotic cells, or the induction of apoptosis of the host cell, suggesting that ClpB and ClpC do not influence the bacterial persistence capacity by affecting bacterial uptake or the programmed cell death systems of the host cells. Similarly, the MazEF toxin-antitoxin system, which is involved in bacterial cell death and which is known to be influenced in its activity by ClpC [Donegan *et al.*, 2010], could be excluded as a mediator/effector of the *clpC*

effect on *in vitro* and *in vivo* survival. Transcriptional analyses with mRNAs obtained from intracellular persisting *S. aureus* cells identified in DSM20231 *clpC* cells reduced *in vivo* transcription rates for global regulators of virulence determinant production such as *sarA* and *RNAIII*, and the  $\alpha$ -toxin encoding *hla* while *spa* transcription, encoding the immunoglobulin G and von Willebrand-factor binding protein A, was found to be enhanced in intracellular persistent DSM20231 *clpC* cells, suggesting a positive influence of ClpC on exoprotein production under *in vivo* conditions.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Bakterium *Staphylococcus aureus*

Die Gattung *Staphylococcus* wird der Familie der Micrococcaceae zugeordnet. Bei Vertretern dieser Familie handelt es sich um Gram-positive Kokken, die in den meisten Fällen Katalase-positiv sind. Sie sind unbeweglich, wachsen fakultativ anaerob und haben ein Bakterienchromosom mit niedrigem GC-Gehalt.

Aktuell sind bis zu 32 Staphylokokkenarten identifiziert, zu denen beispielsweise *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. saprophyticus* gehören.

Um die morphologischen Besonderheiten von *S. aureus* im Vergleich zu anderen Staphylokokkenspezies zu charakterisieren, ist es hilfreich ein Augenmerk auf die Namensgebung zu setzen. Das griechische Wort „*staphyle*“ bedeutet soviel wie „ein Bündel von Trauben“ und bezieht sich auf die Zusammenlagerung von mehreren Kokken zu Haufen. „Kokken“ weist auf die kugelförmige Gestalt hin, „*aureus*“ ist lateinisch und heißt übersetzt goldfarben. Dies ist eine Anlehnung an die großen gelb-goldenen Kolonien, die durch das Carotinoid Staphyloxanthin hervorgerufen werden.

*S. aureus* ist Bestandteil der natürlichen Körperflora, so weisen z.B. 30 bis 50% der gesunden Erwachsenen eine transiente und 10 bis 20% eine persistente Besiedelung mit diesem Keim auf [Casewell & Hill, 1986; Van den Bergh *et al.*, 1999]. Er lässt sich in erster Linie aus Nasenhöhlen, Achseln und dem Dammbereich isolieren [Crossley & Archer, 1997; Hahn *et al.*, 1994]. Jedoch ist *S. aureus* ebenfalls ein opportunistischer Krankheitserreger und für die Mehrheit an durch Staphylokokkenspezies verursachten Infektionen verantwortlich [Deurenberg *et al.*, 2008].

## 1.2 Syntheseregulation von Virulenzfaktoren

Die am besten beschriebenen globalen Regulatoren für die Syntheseregulation von Virulenzfaktoren in *S. aureus* sind der *agr*-Lokus (*a*ccessory *g*ene *r*egulator), der *sarA*-Lokus (*s*taphylococcal *a*ccessory *r*egulator), Sae (*S. aureus* *e*xoprotein expression) und der alternative Sigma-Faktor  $\sigma^B$ . Diese Regulatoren reagieren beispielsweise auf die Bakteriendichte, den pH-Wert oder die Nährstoffverfügbarkeit im umgebenden Milieu und

ermöglichen somit dem Bakterium eine schnelle und exakte Anpassung an veränderte Umgebungsbedingungen.

### 1.2.1 Der *agr*-Lokus

Das Agr Zwei-Komponenten-System besteht aus fünf Genen, die von den beiden Promotoren P2 und P3 reguliert werden. Zu dem P2-Operon zählen die Gene *agrB*, *D*, *C* und *A*. Die Genprodukte AgrB und D bilden ein autoinduzierendes Peptid (AIP), welches sekretiert wird und an die membrangebundene Histidin Kinase AgrC binden kann [Gordon *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1997]. Die Bindung des AIP's an die extrazelluläre Domäne von AgrC führt zur Autophosphorylierung eines zytoplasmatischen Histidinrests [Lina *et al.*, 1998]. Von dort kann das Phosphat auf den Response Regulator AgrA übertragen werden [Peng *et al.*, 1988]. Das phosphorylierte AgrA und SarA können zusammen aber auch unabhängig voneinander die beiden Operons P2 und P3 aktivieren [Cheung *et al.*, 1997]. Im Fall der P2 Aktivierung spricht man von einem autokatalytischen Regulationszyklus [Heinrichs *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1997; Lina *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1988]. Die Aktivierung von P3 resultiert in der Transkription von RNAIII, das ein Effektor für die *agr* spezifische Genregulation ist. Durch den *agr*-Lokus erfolgt beispielsweise eine negative Regulation der Expression von Oberflächenadhäsionsproteinen und positive Expressionsregulation von Exoproteinen [Cheung *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2013].

Insgesamt kodiert das Genom von *S. aureus* für 16 Zwei-Komponenten-Systeme [Arvidson & Tedmark, 2001; Cheung & Zhang, 2002; Novick, 2003]. Für die Regulation von Virulenzfaktoren sind neben dem bereits beschriebenen Agr-System dabei die *Lozi sae*, *srrAB* (*staphylococcal respiratory response*), *arlRS* (*autolysis-related locus*) und *lytRS* [Bronner *et al.*, 2004] von besonderer Bedeutung.

### 1.2.2 Der *sae*-Lokus

Bei dem *sae*-Lokus handelt es sich um ein weiteres, für die Regulation der Virulenzgene in *S. aureus*, bedeutsames Zwei-Komponenten-System. Der *sae*-Lokus besteht aus vier *open reading frames* (ORF's) von denen SaeR den Response Regulator und SaeS die intramembran lokalisierte Histidin Kinase des Zwei-Komponenten-Systems bilden. Zwei weitere ORF's

befinden sich oberhalb von *saeRS*. Von diesen bildet das *saeP* Genprodukt ein Lipoprotein und *saeQ* ein Membranprotein.

Das Zwei-Komponenten-System reagiert spezifisch auf Umgebungssignale, wie z.B. den pH-Wert und die Anwesenheit von  $H_2O_2$ .

SaeRS kontrolliert beispielsweise die Expression des  $\alpha$ -Toxins ( $\alpha$ -Hämolysin), Eap (Extracellular adherence protein) und der Fibronektin-Bindeproteine A und B (FnBPAB) [Mainero *et al.*, 2010; Steinhuber *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2012].

### 1.2.3 Der *sarA*-Lokus

Der *sarA*-Lokus besteht aus drei sich überlappenden Transkripten *sarA*, *sarB* und *sarC*, welche von den Promotoren P1, P3 und P2 kontrolliert werden [Bayer *et al.*, 1996; Manna & Cheung, 2001; Novick, 2003].

Die Regulation der Virulenzfaktoren erfolgt zum einen indem das DNA-Bindeprotein SarA an die P2- und P3-Promotorregionen des *agr*-Lokus bindet und damit sowohl die Transkription des autokatalytischen Regulationszyklus als auch von RNAIII erhöht, wodurch die Expression von Virulenzfaktoren beeinflusst wird. Man spricht in diesem Fall von einem *agr*-abhängigen Syntheseweg. Zum anderen ist eine direkte Bindung von SarA an so genannte Sar-Boxen möglich. Dies sind konservierte Promotorregionen von Zielgenen, wie beispielsweise von zellwandassoziierten Proteinen, wie Protein A und den Fibronektin-Bindeproteinen FnBPA und B oder von Exoproteinen, wie z.B. dem  $\alpha$ -Toxin. Dabei handelt es sich um einen *agr*-unabhängigen Syntheseweg [Bronner *et al.*, 2004].

Die Expression von *sarA* erfolgt in Abhängigkeit der Wachstumsphase und ist zudem  $\sigma^B$ -abhängig [Cheung *et al.*, 1992].

### 1.2.4 Der alternative Sigma-Faktor $\sigma^B$

Das  $\sigma^B$ -Operon besteht aus *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB* [Bischoff *et al.*, 2004; Bischoff & Berger-Bächi, 2001] und ist ein weiteres globales System von *S. aureus* um auf veränderte Umweltreize zu reagieren [Chan *et al.*, 1998; Gertz *et al.*, 1999; Kullik & Giachino, 1997], wie sie z.B. während einem Infektionsprozess oder dem Überleben innerhalb eines Wirts auftreten.

Eine Aktivierung des  $\sigma^B$ -Operons führt zu einer Stimulation des alternativen Sigma-Faktors  $\sigma^B$  und erfolgt im Allgemeinen, wenn die Bakterienzelle Stresssituationen ausgesetzt ist sowie



bei einer verringerten Energieverfügbarkeit, die über ein reduziertes Verhältnis von ATP zu ADP angezeigt wird, aber beispielsweise auch bei Anwesenheit von Ethanol [Chan & Foster, 1998]

Die Expression verschiedener Gene wird entweder direkt oder indirekt von  $\sigma^B$  beeinflusst [Gertz *et al.*, 2000; Kullik *et al.*, 1998]. Darunter fallen Virulenzgene, wie z.B. das  $\alpha$ -Hämolysin [Giachino *et al.*, 2001; Horsburgh *et al.*, 2002], Proteasen [Horsburgh *et al.*, 2002; Karlsson & Arvidson, 2002] oder auch das FnBPA [Nair *et al.*, 2003]. Zudem beeinflusst  $\sigma^B$  die Expression von einigen Regulatoren der Virulenzfaktoren, wie beispielsweise SarA und RNAIII [Bischoff *et al.*, 2001; Depke *et al.*, 2012; Horsburgh *et al.*, 2002].

### 1.3 Persistierende Infektionen durch *S. aureus*

Durch *S. aureus* verursachte Erkrankungen können neben einem akuten ebenfalls einen chronischen, bzw. immer wiederkehrenden Verlauf nehmen. Diese persistierenden Infektionen treten oftmals bei Krankheitsbildern wie z.B. der Mukoviszidose und der Osteomyelitis auf [Gilligan *et al.*, 1987; Sadowska *et al.*, 2002; von Eiff *et al.*, 1997a] und sind typischerweise resistent gegenüber Antibiotikatherapien. Zwischen den einzelnen Krankheitsausbrüchen können Symptom-freie Perioden von bis zu 50 Jahren liegen [Greer & Rosenberg, 1993]. Um erfolgreich über längere Zeitperioden im Wirt existieren zu können, bedient sich *S. aureus* u.a. der Fähigkeit einer Biofilmbildung [Babra *et al.*, 2013; Costeron *et al.*, 1999], der Invasion in die Wirtszelle [Fowler *et al.*, 2000; Ridley *et al.*, 2012] oder auch der Formation des „Small-Colony-Variant“ (SCV) Phänotyps [Kahl, 2013; Proctor *et al.*, 1995]. Der SCV Phänotyp wird in Kap. „5 Diskussion“ näher beschrieben.

#### 1.3.1 Biofilmbildung durch *S. aureus*

Die Biofilmbildung erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Bei dem ersten Schritt adhären einzelne Bakterienzellen an eine Oberfläche. Dieser primären Adhäsion folgt die Akkumulationphase, d.h. die Bindung weiterer Bakterienzellen an bereits an eine Oberfläche adhären Bakterienzellen. Die einzelnen Schritte werden ausführlich in Kap. „5 Diskussion“ erläutert.

In einem Biofilm zusammen lebende Bakterien unterscheiden sich in verschiedenen Aspekten von planktonisch vorkommenden Varianten. Die erhöhte Persistenz von Biofilm-Bakterien beruht auf einem reduzierten Metabolismus [Hattori & Hattori, 1976] und einem

verlangsamtes Zellwachstum [Brown *et al.*, 1988], wodurch sich ebenfalls eine erhöhte Antibiotikaresistenz [Chuard *et al.*, 1991] erklären lässt. Einige der im Biofilm lebenden Bakterien leiden unter Sauerstoff- und Nährstoffmangel und sind zudem einer Anhäufung an Stoffwechselendprodukten ausgesetzt [Schramm *et al.*, 2000]. Dies führt zu einer Verringerung oder totalen Einstellung des Wachstums und demzufolge zu einer geringeren Suszeptibilität gegenüber Zellwand-aktiven Antibiotika [Brown & Williams, 1985]. Zudem hemmt die negativ geladene Biofilm-Matrix die Diffusion von beispielsweise positiv geladenen Aminoglykosiden [Nichols *et al.*, 1988].

### 1.3.2 Zelluläre Invasion durch *S. aureus* und post-invasive Ereignisse

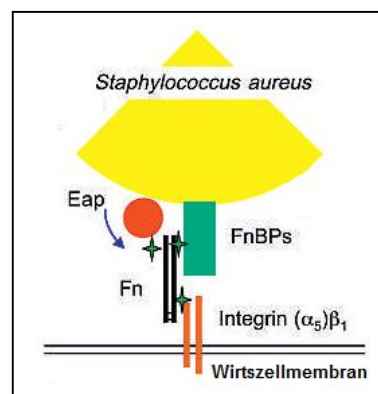
Als fakultativ intrazellulärer Mikroorganismus hat *S. aureus* die Fähigkeit in Gewebe einzudringen und intrazellulär zu persistieren [Ogawa *et al.*, 1985; Sinha & Fraunholz, 2010]. Die Invasion in Wirtszellen stellt dabei für *S. aureus* einen wichtigen Mechanismus dar, um eine dauerhafte, persistierende Kolonisierung zu etablieren, die mit chronischen bzw. immer wieder auftretenden Erkrankungen einhergeht [Grundmeier *et al.*, 2010; Proctor *et al.*, 2006]. Innerhalb der eukaryoten Zelle bleiben die Bakterien vom Immunsystem des Wirts nahezu unerkant [Chatterjee *et al.*, 2007; Herrmann *et al.*, 1997; Kahl *et al.*, 2005; Samuelsen *et al.*, 2005]. Intrazellulär ist *S. aureus* eine „stille“ Kolonisierung über längere Zeitperioden möglich, indem der Metabolismus und die Expression von Virulenzfaktoren des Bakteriums herunter reguliert werden.

Eine hohe Rückfallquote von *S. aureus* Infektionen, mit dokumentierten klinischen Fällen bei denen asymptomatische Perioden von Monaten bis zu Jahren nach Antibiotikabehandlung mit vermeindlicher Kurierung vergehen, verdeutlichen die Prominenz intrazellulär persistierender *S. aureus* [Greer & Rosenberg, 1993; Kipp *et al.*, 2003; Proctor *et al.*, 1995; von Eiff *et al.*, 1997a]. Bereits 1986 gab es erste Beobachtungen von intrazellulär lokalisierten *S. aureus* nach Co-Inkubation mit nicht-professionell phagozytierenden Zellen [Hamill *et al.*, 1986], wie beispielsweise Osteoblasten, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzelllinien [Bayles *et al.*, 1998; Hagger *et al.*, 2003].

Der erste entscheidende Schritt von *S. aureus* bei der Invasion ist die Bindung an die Wirtszelle. Diese wird durch die „Clumping Factors“ ClfA und ClfB, das zellwand-assoziierte Protein Eap sowie die in der Bakterienzellwand verankerten Oberflächenproteine FnBPAB

vermittelt [Dziewanowska *et al.*, 1999; Foster & Höök, 1998; Signas *et al.*, 1989; Sinha *et al.*, 1999]. Mit diesen erfolgt eine spezifische Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix von Wirtszellen, wie z.B. Kollagen, Fibrinogen und Fibronectin [Foster & Höök, 1998; Patti *et al.*, 1994].

Der Adhäsion folgt die Invasion in die Wirtszelle, bei der ebenfalls die FnBP's eine entscheidende Rolle spielen. Die Invasion erfolgt nach dem „Zipper“-Mechanismus [Isberg & van Nhieu, 1994]. Die Bakterien binden via der FnBP's A und B, mit dem Fibronectin auf der Wirtsoberfläche als Brückenmolekül, an das  $\alpha_5\beta_1$  Integrin des Wirts [Dziewanowska *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999] (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Modell des Invasionsprozess von *S. aureus*.** Die Fibronektin-Bindeproteine (FnBP's) von *S. aureus* binden via des Wirts-Fibronektin (Fn) als Brückenmolekül an das  $\alpha_5\beta_1$  Integrin des Wirts. Als Resultat kommt es zu einer Neuordnung des F-Actins und zur Invasion in die Wirtszelle. Das extrazelluläre Adhärenzprotein Eap trägt ebenfalls zur Internalisierung bei [modifiziert nach: Sinha & Fraunholz, 2010].

Es folgen eine Neuordnung des F-Actins, eine Phosphorylierung von Tyrosin, ERK-1 und ERK-2 und die Aktivierung der Src-Kinase, woraufhin die Phagozytose der Bakterienzellen stattfindet [Sinha & Herrmann, 2005]. Diese spielen bei diesem Prozess keine aktive Rolle [Sinha *et al.*, 1999]. Tote und lebende Bakterien werden gleichermaßen aufgenommen bzw. internalisiert [Hamill *et al.*, 1986]. Dziewanowska *et al.* [2000] konnten zeigen, dass bei Epithelzellen zudem eine Interaktion zwischen den FnBP's und dem von der Wirtszelle exprimierten HSP60 (Hitze Schock Protein 60) stattfindet. Eine weitere wichtige Bedeutung bei der Internalisierung in v.a. Fibroblasten und Epithelzellen wurde für Eap nachgewiesen. Eine Vorinkubation mit Eap erhöht die Adhäsion an und Internalisierung in eukaryote Zellen [Haggar *et al.*, 2003; Palma *et al.*, 1999]. Eap bindet an zahlreiche Wirtsfaktoren, wie Fibronectin, Fibrinogen und Kollagen aber auch an ICAM-1, ein Adhäsionsmolekül von

Endothelzellen [Chavakis *et al.*, 2005; Palma *et al.*, 1999]. Es wird vermutet, dass die Bindung von *S. aureus* an die Wirtszelle durch Eap ähnlich erfolgt wie durch die bereits erwähnten FnBP's. Allerdings fördert exogenes Eap, im Gegensatz zu den FnBP's, auch die Aufnahme von weiteren Bakterien wenn diese nicht direkt an das Integrin der Wirtszelle gebunden vorliegen. Dadurch werden z.B. auch Bakterien, die über weitere Matrixmoleküle an die Wirtszelle gebunden sind, internalisiert. Vermutlich erfolgt eine Actin-abhängige Phagozytose der Bakterienzellen [Bur *et al.*, 2013].

Die Internalisierung erfolgt in Abhängigkeit der Temperatur, Menge an Bakterien und der Zeit [Sinha *et al.*, 1999]. Der Mechanismus der Internalisierung beinhaltet ein Umschließen der Bakterienzellen durch die Wirtszellmembran beim Eintritt in die Wirtszelle, sodass die Bakterien innerhalb der Zelle in Endosomen lokalisiert vorliegen, die im Falle von Endothelzellen bereits wenige Minuten nach der Internalisierung zu Phagosomen heranreifen [Schröder *et al.*, 2006]. In diesen ist es *S. aureus* möglich über längere Zeitperioden zu überdauern und somit sowohl der Immunabwehr zu entgehen aber auch ungünstige Umgebungsbedingungen wie z.B. Nährstoffmangel zu überdauern. Zudem ist das Pathogen innerhalb der eukaryoten Wirtszelle auch vor einer Therapie mit Antibiotika wie z.B.  $\beta$ -Lactamen geschützt, die nicht in die eukaryote Zellen penetrieren können [Hof, 1998]. Während des Vorgangs der Internalisierung aber auch nach dem Eintritt in die Wirtszelle und der darauffolgenden intrazellulären Persistenz bedarf es einer exakten Regulation der einzelnen Virulenzfaktoren. Für die initiale Anhaftung der Pathogene an die Oberfläche der Wirtszelle werden zunächst die FnBP's verstärkt exprimiert, während der intrazellulären Persistenz wird deren Expression herunter reguliert, und sie wird erst bei intrazellulär persistierenden *S. aureus*, aufgrund derzeit noch ungeklärter Signale, wieder verstärkt exprimiert um die Aufnahme in „neue“ Wirtszellen zu erleichtern [Tuchscherr *et al.*, 2011]. Phagosome haben die Fähigkeit mit Lysosomen zu sogenannten Phago-Lysosomen zu verschmelzen, wodurch sie mit reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies angereichert werden, die zu einer Abtötung der Pathogene führen [Schröder *et al.*, 2006]. Deshalb ist für *S. aureus* eine *agr* Expression direkt nach der Internalisierung wichtig um die Maturation des Phagosoms und damit die bakterielle Degradierung zu verhindern [Schnaith *et al.*, 2007]. Auf der anderen Seite muss die *agr* Expression in persistierenden *S. aureus* herunter reguliert werden, um eine Abtötung der Wirtszelle zu vermeiden [Haslinger-Löffler *et al.*, 2006;

Schnaith *et al.*, 2007]. Außerdem ist bekannt, dass *S. aureus* *agr* regulierte Toxine, wie die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Toxine für die Freisetzung aus dem Phagosom nutzt, um zu replizieren und anschließend „neue“ Wirtszellen zu befallen [Giese *et al.*, 2011; Sinha & Fraunholz, 2010; Sinha & Fraunholz, 2012].

Die Gattungen *Chlamydia*, *Legionella* und *Salmonella* haben die Fähigkeit aktiv mit den regulatorischen Mechanismen der Wirtszelle zu interferieren, wodurch Membranumschlossene Vesikel gebildet werden, in denen ein Überleben der Pathogene innerhalb der Wirtszelle ermöglicht wird. Zusätzlich können diese Bakterien die Heranreifung und Ansäuerung der Phagosome zu ihren Gunsten verändern. Bei den Pathogenen *Shigella* und *Listeria* findet hingegen eine Lyse des Phagosoms und anschließend Replikation im Zytoplasma der Wirtszelle statt [Hackstadt, 2000; Meresse *et al.*, 1999]. Diesbezüglich suggerierten Bayles und Kollegen [1998] eine Freisetzung von *S. aureus* aus Phagosomen mit darauf folgendem Verweilen im Wirts-Zytoplasma. Im Gegensatz dazu wiesen Untersuchungen von Schröder *et al.* [2006] darauf hin, dass internalisierte Staphylococci, wie z.B. SCV's und *S. carnosus*, in Lysosomen überdauern.

## 1.4 Hitze-Schock Antwort

Unter Hitze-Schock wird ein schneller Anstieg der Umgebungstemperatur verstanden. Dieser resultiert in einer steigenden Zahl an abnormalen Polypeptiden, aufgrund einer fehlerhaften Translation, einer inkorrekten Proteinfaltung oder -assemblierung oder etwa durch Hitzedenaturierung und Aggregation [Welch, 1993]. Die Zunahme an denaturierten sowie aggregierten Proteinen ist ein Trigger für die Synthese von Hitze-Schock Proteinen (HSP's). Viele HSP's werden nur unter Stressbedingungen synthetisiert, wobei einige auch unter optimalen Umgebungsbedingungen in einer geringeren Menge vorhanden sind [Clarke, 1996]. HSP's schützen die Bakterienzelle jedoch nicht ausschließlich vor Hitze-Stress, sondern haben generell eine protektive Wirkung während ungünstiger Umweltbedingungen, die zu geschädigten Proteinen führen. Darunter fallen z.B. hohe Salzkonzentrationen und Schwermetalle [Hecker & Volker, 1998; Van Boglen *et al.*, 1987] oder beispielsweise von Wirtszellen zum Schutz vor Pathogenen produzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS).

Neben den bereits erwähnten globalen Regulatoren (Kap. 1.2), die spezifisch die Expression von bestimmten Genen regulieren, besitzen die Bakterienzellen mit den HSP's einen weiteren Mechanismus um auf veränderte Umweltreize zu reagieren.

In dem Gram-positiven Organismus *Bacillus subtilis* werden vier Klassen von Hitze-Schock Genen unterschieden. Die Klasse I wird über den Repressor HrcA kontrolliert und kodiert für klassische Chaperone wie Dnak, GroES und GroEL. Klasse II Gene kodieren generell für Stress-Proteine, deren Expression den unter Stress aktivierten alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^B$  benötigt. Die Transkription der Klasse III Hitze-Schock Gene werden durch den Repressor CtsR (Class three stress gene repressor) gehemmt. Klasse IV wird mittels HrcA,  $\sigma^B$  und/oder CtsR kontrolliert [Versteeg *et al.*, 2003].

### 1.4.1 HSP100/Clp ATPasen und Clp proteolytische Komplexe

Entsprechend ihrer Bezeichnung haben die HSP's 100 eine molekulare Masse von rund 100 kDa. Sie zählen zu den Klasse III Hitze-Schock Genen (Kap. 1.4), sodass zu ihrer Aktivierung ein Abbau bzw. eine Inaktivierung des Repressors CtsR nötig ist [Derre *et al.*, 2000; Krüger *et al.*, 2001].

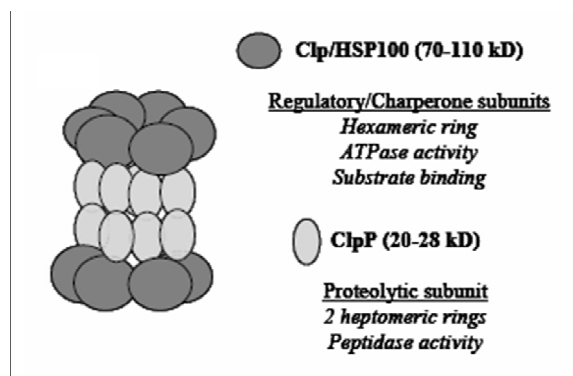
Die Bezeichnung „Clp“ steht für „caseinolytic protein“ (kaseinolytisches Protein) und gründet auf der ersten identifizierten Clp ATPase ClpA aus *Escherichia coli*, welche als Komplex mit ClpP zur Proteolyse von Kasein führt [Schirmer *et al.*, 1996].

Bei den HSP100/Clp ATPasen handelte es sich um eine Gruppe nahe verwandter Proteine, die hoch konserviert und universal sowohl im Zytosol von pflanzlichen als auch tierischen Zellen und Prokaryonten vorkommen. Zudem zählen die HSP100/Clp ATPasen zur AAA<sup>+</sup> Superfamilie, welche sich durch eine konservierte Region von rund 220 Aminosäuren auszeichnet, die auch als AAA-Domäne bekannt ist. Die AAA-Domäne enthält u.a. die sogenannten Walker A und Walker B Motive, die für die ATP Bindung und Hydrolyse zuständig sind [Neuwald *et al.*, 1999].

Es werden zwei Klassen von HSP100/Clp ATPasen unterschieden. Die Klasse 1 Clp Proteine besitzen zwei ATP Bindungsstellen, ATP-1 und ATP-2 und sind mit 68 bis 110 kDa relativ groß. Eine weitere Unterteilung in ClpA, ClpB, ClpC, ClpD, ClpE und ClpL basiert auf der variablen Länge der Spacer-Region zwischen den beiden ATP Bindungsstellen und spezifischen Erkennungssequenzen. Die Klasse 2 Clp Proteine sind mit 46 kDa deutlich kleiner und haben nur eine ATP Bindestelle, die ATP-2 ähnelt. Zu dieser Klasse 2 gehören ClpX und ClpY [Schirmer *et al.*, 1996]. In dem Genom von *S. aureus* kodieren die Gene *clpB* (SA 0835), *clpC* (SA 0483), *clpL* (SA 2336), *clpX* (SA 1498) und *clpY* (SA 1097) für Clp ATPasen, wobei sich die Genkennzeichnung auf das *S. aureus* Genom des Stammes N315 bezieht.

Zudem sind zwei Gene, die für Clp Proteasen kodieren, bekannt. Dabei handelt es sich um *clpP* (SA 0723) und *clpQ* (SA 1096) [Kuroda *et al.*, 2001].

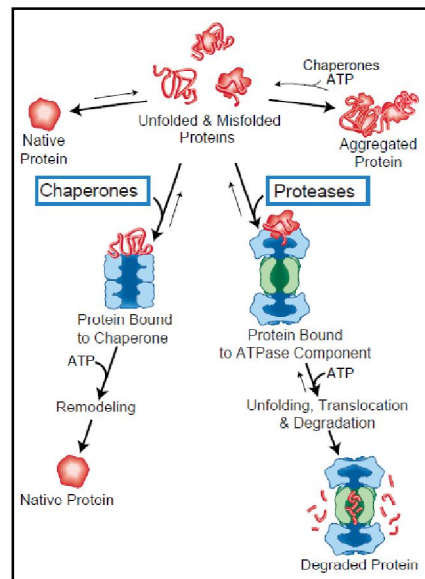
Von den erwähnten Clp ATPasen haben ClpC, ClpX und ClpY die Fähigkeit zusammen mit einer Clp Protease einen Clp proteolytischen Komplex zu bilden. Die HSP100/Clp ATPasen sind aus einem hexameren Ring aufgebaut, durch den Substrate spezifisch gebunden werden. Die ClpP Protease besteht aus zwei heptameren Ringen mit Peptidaseaktivität (Abb. 1.2) [Flanagan *et al.*, 1995].



**Abb. 1.2: Modell eines Clp proteolytischen Komplex von *S. aureus*.** Die beiden HSP100/Clp ATPasen bilden hexamere Ringe und haben neben einer substratspezifischen Funktion ebenfalls ATPase Aktivität. Der proteolytischen Kern ClpP wird von HSP100/Clp ATPasen flankiert und besteht aus heptameren Ringen [Flanagan *et al.*, 1995].

Bei dem Clp proteolytischen Komplex ist die Clp ATPase für die spezifische Bindung eines fehlgefalteten Substrates zuständig und führt unter Energieverbrauch in Form von ATP eine erste Entfaltung des Substrates durch, sodass es den proteolytischen Kern passieren und dort abgebaut werden kann [Arvidson & Tegmark, 2001; Hoskins *et al.*, 1998; Hoskins *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2013].

Während die HSP100/Clp ATPasen in ihrer Funktion als molekulare Chaperone beispielsweise für eine schnelle Proteinfaltung nach deren Synthese, korrekten Rückfaltung von fehlgefalteten Proteinen oder der Aufrechterhaltung der Proteinkonformation unter z.B. Hitzestress benötigt werden, führen die Clp proteolytischen Komplexe zu einer Degradierung von irreversibel geschädigten Proteinen (Abb. 1.3) [Wickner *et al.*, 1999].



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Funktionsweise von HSP100/Clp ATPasen und des Clp proteolytischen Komplex.** Während HSP100/Clp ATPasen für eine schnelle Proteinfaltung nach deren Synthese und einer Korrekturfaltung von fehlgefalteten Proteinen zuständig sind, führt der Clp proteolytische Komplex einen Abbau von irreversibel geschädigten Proteinen durch [Wickner *et al.*, 1999].

Allerdings findet ein Zusammenschluss mit der Protease ClpP nur mit den ATPasen ClpC und ClpX statt. Die ATPase ClpY bildet mit der Protease ClpQ einen proteolytischen Komplex. ClpQY ist auch als HsIVU (Heat Shock Locus VU) bekannt und wird in der Literatur als „bakterielles Proteasom“ beschrieben [Bochtler *et al.*, 2000; Groll *et al.*, 2005]. Dies hat zum Teil etwas mit dem Vorhandensein einer aktiven Threoninseite zu tun, wie man sie ebenfalls in 26S Proteasomen von eukaryoten Zellen vorfindet. Ein weiterer Unterschied von ClpQ ist die Formation von Hexameren an Stelle der bereits erwähnten Heptamere von ClpP [Butler *et al.*, 2006].

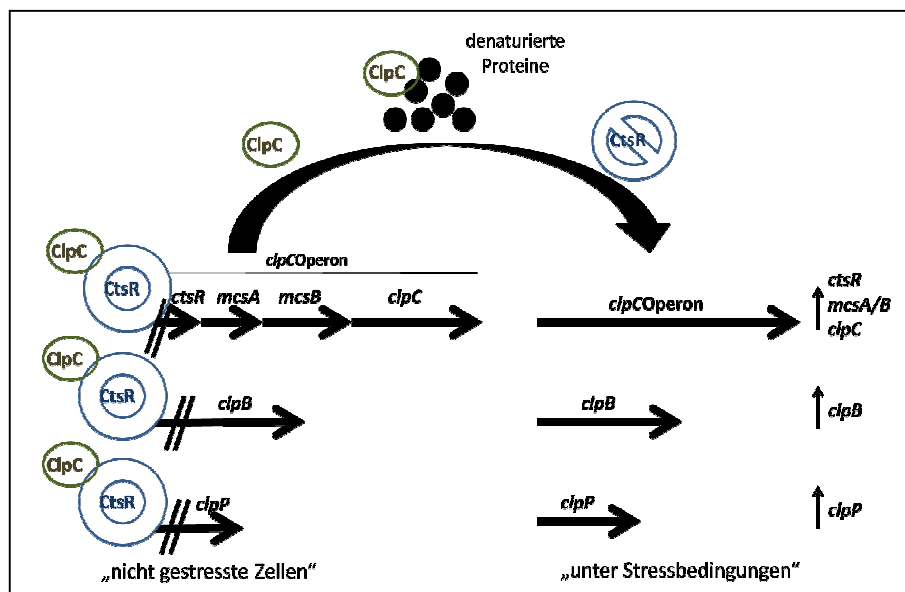
In Experimenten mit *S. aureus* kann eine gewisse Stammabhängigkeit von Resultaten beobachtet werden, wie z.B. die Untersuchungen zur Biofilmbildung durch Frees *et al.* [2004] und Becker *et al.* [2001] verdeutlichen. Becker *et al.* [2001] konnten mittels Northern Blot Analyse eine signifikant erhöhte Expression der HSP100/Clp ATPase ClpC in biofilmbildenden *S. aureus* aufzeigen. Eine Inaktivierung des *clpC*-Gens in dem *S. aureus* Stamm DSM20231 führte jedoch zu keiner markanten Beeinflussung der Biofilmbildung *in vitro*. Hingegen wiesen Frees *et al.* [2004] unter Verwendung des *S. aureus* Stammes 8325-4 eine verringerte Biofilmbildung einer *clpC*-Mutante nach. Um eine eindeutige Aussage über die Funktionen



der Clp ATPasen (ClpB, ClpC, ClpL, ClpX und ClpY) von *S. aureus* treffen und diese untereinander vergleichen zu können, bedarf es der Untersuchung aller Clp ATPasen in einem genetischen Hintergrund. Ein Ziel dieser Dissertation ist deshalb die Mutation der einzelnen Clp ATPasen in *S. aureus* DSM20231 und Verifizierung deren Einfluss auf das Langzeitüberleben.

### 1.4.2 Die HSP100/Clp ATPasen ClpB und ClpC

Die beiden HSP100/Clp ATPasen ClpB und ClpC gehören zu den Hitze-Schock Proteinen der Klasse III, deren Expression über den negativen Hitze-Schock Regulator CtsR kontrolliert wird [Derre *et al.*, 2000; Krüger *et al.*, 2001; Versteeg *et al.*, 2003]. Das Gen *clpC* ist außerdem ein Teil des tetracistronischen Operons *ctsR-mcsA-mcsB-clpC* (Abb. 1.4) [Chastanet *et al.*, 2003; Krüger *et al.*, 2000, Schumann *et al.*, 2002; Frees *et al.*, 2004; Wozniak *et al.*, 2012].



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung der Transkriptionskontrolle des *clpC* Operons *ctsR-mcsA-mcsB-clpC*, *clpB* und *clpP* durch den negativen Hitze-Schock Regulator CtsR in *S. aureus*. ClpC ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der aktiven Konformation von CtsR in „nicht gestressten Bakterienzellen“. Durch Stressbedingungen denaturierte Proteine titrieren ClpC weg von CtsR, wodurch dieser seine aktive Konformation verliert und zuvor reprimierte Gene, wie, *clpB*, *clpP* und Gene des *clpC* Operons, nun transkribiert werden [erstellt nach: Chastanet *et al.*, 2003].

ClpC ist in seiner Eigenschaft als molekulares Chaperon zuständig für die Aufrechterhaltung der aktiven, DNA-bindenden Konformation von CtsR. Unter „normalen“ physiologischen Bedingungen wird die Transkription von *ctsR*, *clpB*, *clpC* und *clpP* durch eine spezifische

Interaktion von CtsR mit den Promotorregionen dieser Gene reprimiert [Derre *et al.*, 1999; Frees *et al.*, 2004]. Mehrten sich fehlgefaltete Proteine unter ungünstigen Umgebungsbedingungen, wie z.B. hohen Temperaturen oder hohen Salzkonzentrationen, erfolgt eine Titration von ClpC in Richtung der denaturierten Proteine, wodurch CtsR die aktive Konformation verliert. Dadurch verliert der Repressor seine Bindungsaffinität an die Promotorregionen, was in einer Transkription von zuvor durch CtsR reprimierter Gene, wie *ctsR*, *clpB*, *clpC* und *clpP*, resultiert (Abb. 1.4). Sobald das Level an geschädigten Proteinen ein normales Niveau erreicht hat, kann ClpC wieder vermehrt aktives CtsR regenerieren, wodurch eine Feedback-Regulation des CtsR Regulons sichergestellt wird [Frees *et al.*, 2004]. Es ist bekannt, dass in Bakterienzellen ohne *clpC* nachweislich mehr *clpB* vorhanden ist [Chatterjee *et al.*, 2009b; Frees *et al.*, 2004].

ClpB ist für die Entwicklung von Thermotoleranz und ebenso wie ClpC und ClpP zum Schutz von Proteinen bei abnormalen Temperaturen wichtig. Von ClpB und ClpC ist zudem bekannt, dass ihre Abwesenheit die intrazelluläre Multiplikation von *S. aureus* 8325-4 in MacT-Zellen reduziert [Frees *et al.*, 2004].

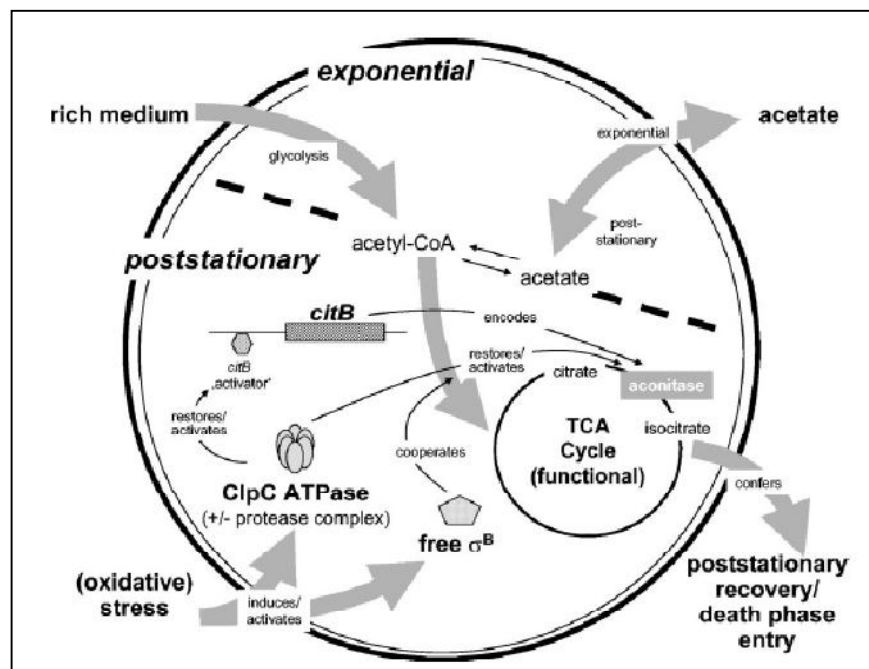
Chatterjee *et al.* [2005] konnten neben der Resistenz gegenüber oxidativem Stress v.a. eine tragende Rolle von ClpC bei der Aufrechterhaltung der Aktivität des Zitratzyklusenzym Aconitase (CitB) in der stationären Wachstumsphase des *S. aureus* Isolats DSM20231 identifizieren. Die Aktivität von CitB ist ein Marker für einen funktionierenden Zitratzyklus, durch den wiederum Azetat während der post-stationären Phase als sekundäre Kohlenstoffquelle katabolisiert werden kann.

### **1.4.3 Die Rolle der HSP100/Clp ATPase ClpC im oxidativen Metabolismus von *S. aureus***

Bei einer Kultivierung des *S. aureus* Isolats DSM20231 und der isogenen *clpC*-Mutante über einem Zeitraum von 7 Tagen konnte in den ersten 48 Std. zunächst ein typisches bakterielles Wachstum mit einer beginnenden *lag*-Phase, darauf folgender exponentieller Verdoppelung der Bakterienzellen, anschließender stationärer und schließlich der Eintritt in die Absterbephase beobachtet werden. Nach der Sterbephase erfolgte in der post-stationären Phase von 48 bis 72 Std. eine erneute Zunahme der Bakteriendichte und der Lebendkeimzahl, woraufhin die Zellen unwiderruflich in die Sterbephase (72 bis 168 Std.) eintraten. Interessanterweise wies die *clpC*-Mutante keinen sogenannten post-stationären

„regrowth“ (erneute Replikation) von 48 auf 72 Std. auf. Stattdessen trat die *clpC*-Mutante während den 7 Tagen in Kultur nicht in die finale Sterbephase ein und wies damit im Vergleich zum *S. aureus* Wildtyp (WT) ein deutlich erhöhtes Langzeitüberleben auf.

Die Ursache für dieses beobachtete Wachstumsphänomen des „regrowth“ liegt in der Metabolisierung von Azetat (Abb. 1.5) [Chatterjee *et al.*, 2005].



**Abb. 1.5: Hypothetisches Schema der Rolle von ClpC im oxidativen Metabolismus von *S. aureus*.** Während des exponentiellen Wachstums wird Glucose schnell katabolisiert und akkumuliert als Azetat im Medium. In der spät-stationären Phase generieren die Zellen Energie in Form von ATP hauptsächlich über den Zitratzyklus. Für die Funktion des Zitratzyklusenzym Aconitase wird ClpC benötigt. Eine Inaktivierung von ClpC resultiert in einem Verlust der *citB* (Aconitase) Transkription, damit in einem Verlust der Aconitase- und Zitratzyklusaktivität und der Azetatakkumulation. Bei oxidativem Stress aktiviert ClpC möglicherweise einen Transkriptionsaktivator von *citB* oder hält die aktive Konformation der Aconitase aufrecht. Dies führt zu einem sogenannten „regrowth“ der Bakterienzellen, gefolgt von einem Eintritt in die Sterbephase. Zudem scheint  $\sigma^B$  über einen aktuell unbekannten Mechanismus bei der Aufrechterhaltung der Aconitaseaktivität einen Einfluss zu haben [Chatterjee *et al.*, 2005].

Durch die Glykolyse wird zunächst die im Wachstumsmedium vorhandene Glucose abgebaut und es entsteht Pyruvat. Dieses wird unter aeroben Bedingungen zu Acetyl-CoA und schließlich zu Acetyl-Phosphat katabolisiert. Acetyl-Phosphat wird anschließend via Substratkettenphosphorylierung zur Generierung von ATP und Azetat verwendet [Chatterjee *et al.*, 2005]. Die somit erzeugte Energie in Form von ATP wird für die Zellteilung im

exponentiellen Wachstum verwendet, wobei das im Zytosol gebildete Azetat an das umgebende Medium abgegeben wird. Das im Medium angehäuften Azetat wird nach Depletion der Glucose als sekundäre Kohlenstoffquelle zur Energieerzeugung genutzt, indem es in den Zitratzyklus, der bei 72 Std. die höchste Aktivität aufweist, eingeschleust und metabolisiert wird. Dies führt zu dem post-stationären „regrowth“ von *S. aureus* DSM20231 nach 72 Std. in Kultur. Durch die Atmungskette bzw. oxidative Phosphorylierung werden zudem auch ROS generiert, sodass die Zelle zunehmend oxidativem Stress ausgesetzt ist. Dieser führt u.a. zur Induktion der HSP100/Clp ATPase ClpC. ClpC ist in diesen späten Wachstumsphasen nachweislich für die Aufrechterhaltung der CitB- und somit auch der Zitratzyklusaktivität unentbehrlich [Chatterjee *et al.*, 2005]. Das Zitratzyklusenzym Aconitase (kodiert durch *citB*, bzw. *acnA*) konvertiert Citrat zu Isocitrat. Es ist nachgewiesen, dass ClpC mit einem aktuell unbekannten Mechanismus als Clp ATPase oder Clp proteolytischer Komplex entweder einen Aktivator der *citB* Transkription aktiviert oder die aktive Konformation von CitB aufrechterhält. Zudem scheint  $\sigma^B$  über einen aktuell unbekannten Mechanismus bei der Aufrechterhaltung der CitB-Aktivität einen Einfluss zu haben.

Nach dem „regrowth“ treten die Bakterienzellen unwiderruflich in die Sterbephase ein. Zum einen sind alle Kohlenstoffquellen aufgebraucht, zum anderen haben sich toxische Stoffe, wie Stoffwechselendprodukte und ROS angereichert. Die Anhäufung von ROS führt zunehmend zu denaturierten Proteinen, die ab einer gewissen Menge durch die vorhandenen Chaperone nicht mehr in ihre ursprüngliche Konformation rückgefaltet werden können. Beispielsweise enthält CitB ein Eisen-Schwefel Cluster, welches hoch sensibel gegenüber einer oxidativen Inaktivierung ist [Somerville *et al.*, 2002]. Zudem ist bekannt, dass der Eintritt in die Sterbephase ein energieabhängiger Prozess ist und Zellen des WT mit der Nutzung der sekundären Kohlenstoffquelle Azetat zur Energiegewinnung nicht nur ein erneutes Wachstum einleiten, sondern auch die zum Eintritt in die Sterbephase benötigte Energie generieren [Chatterjee, 2005].

*S. aureus* Zellen ohne aktives ClpC, wie eine *clpC*-Mutante, weisen eine deutlich verringerte CitB- und Zitratzyklusaktivität auf, sowie eine erhöhte Carbonylierung der Zitratzyklusenzyme Malat:Chinon-Oxidoreduktase (Mqo2) und Fumarat-Hydratase (FumC) [Chatterjee *et al.*, 2005; 2011], weshalb keine detektierbare Metabolisierung des Azetats stattfindet. Dementsprechend bleibt ein „regrowth“ aus, es werden aber auch weniger toxische Endprodukte im Vergleich zu den Wildtypzellen angereichert. Dies und die fehlende

Energie zum Eintritt in die Sterbephase sind vermutlich die Ursache für das deutlich verbesserte Langzeitüberleben einer *clpC*-Mutante [Chatterjee, 2005].

## 1.5 Zielsetzungen dieser Arbeit

Aufbauend auf die Arbeiten von Chatterjee *et al.* [2005, 2009b, 2011] war das primäre Vorhaben dieser Arbeit eine detaillierte Charakterisierung der Bedeutung von ClpC für das Langzeitüberleben von *S. aureus* unter *in vivo* Bedingungen. Da die bisherigen Studien zu ClpC nahezu ausschließlich unter *in vitro* Bedingungen durchgeführt wurden, sollte im Rahmen dieser Arbeit nun die Bedeutung von ClpC für das Langzeitüberleben von *S. aureus* in humanen epithelialen wie endothelialen Zelllinien sowie im Tiermodell untersucht werden. Um der genetischen Heterogenität in dieser Gram-positiven Spezies Rechnung zu tragen, sollte zudem der Einfluß von ClpC auf das *in vitro* und *in vivo* Langzeitüberleben in mehreren, genetisch nicht nahe verwandten *S. aureus* Isolaten bestimmt werden. Da in vorangegangenen Arbeiten eine Erhöhung der ClpB Expression in *S. aureus* Zellen ohne funktionalem ClpC beobachtet wurde [Chatterjee *et al.*, 2009b; Frees *et al.*, 2004], sollte des Weiteren auch die Rolle von ClpB im Langzeitüberleben von *S. aureus* unter *in vivo* Bedingungen getestet werden. Schließlich sollten mögliche Ursachen für das verbesserte Langzeitüberleben von *S. aureus clpC*-Mutanten innerhalb eukaryoter Zellen ermittelt werden. Hierzu wurden Aspekte wie (i) der Einfluss auf die Apoptose der verwendeten eukaryoten Zelllinien, (ii) der bakterielle programmierte Zelltod über das Toxin-Antitoxin System MazEF und (iii) die *in vivo* Transkription an der Virulenzregulation von *S. aureus* beteiligter globaler Regulatoren, wie Agr, SarA und  $\sigma^B$ , untersucht.

## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme und eukaryote Zelllinien

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	relevante Merkmale/ Genotyp	Referenz
<i>Staphylococcus aureus</i>		
DSM20231	Wildtyp, Standard Laborstamm (DSMZ)	Silvestri & Hill, 1965
DSM20231 <i>clpB</i>	DSM20231, <i>clpB::tetL</i> , Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
DSM20231 <i>clpC</i> (PBM001)	DSM20231, <i>clpC::ermB</i> , Erm <sup>R</sup>	Becker <i>et al.</i> , 2001
DSM20231 <i>clpB/clpB</i> <sup>+</sup>	DSM20231, <i>clpB::pEC1_SA0835</i> <sup>+</sup> , Erm <sup>R</sup>	diese Arbeit
DSM20231 <i>clpC/clpC</i> <sup>+</sup>	DSM20231, <i>clpC::pBT_SACOL0570</i> <sup>+</sup> , Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
DSM20231 $\Delta mazEF$ (DSM136)	DSM20231, <i>mazEF::lox72</i>	Bertram, 2012, nicht publiziert
DSM20231 <i>clpC</i> $\Delta mazEF$ (DSM136 <i>clpC</i> )	DSM136, <i>clpC::ermB</i> , Erm <sup>R</sup>	diese Arbeit
DSM20231 <i>sigB</i> (MB290)	DSM20231, <i>sigB1</i> (Am) Tet <sup>R</sup> ,	Chatterjee <i>et al.</i> , 2005
DSM20231 <i>clpC sigB</i> (MB288)	MB290, <i>clpC::ermB</i> , Erm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	Chatterjee <i>et al.</i> , 2005
LS1	murines Arthritis Isolat, <i>rsbU</i> <sup>+</sup>	Bremell <i>et al.</i> , 1992
LS1 <i>clpC</i>	LS1, <i>clpC::ermB</i> , Erm <sup>R</sup>	diese Arbeit
N315	MRSA, klinisches Isolat	Kuroda <i>et al.</i> , 2001

Newman T.F.	Wildtyp, Coagulase <sup>+</sup>	Duthie & Lorenz, 1952
Newman T.F. <i>clpC</i>	Newman T.F., <i>clpC::ermB</i> , Erm <sup>R</sup>	diese Arbeit
Newman T.F. <i>clpC/clpC</i> <sup>+</sup>	Newman T.F., <i>clpC::pBT_SACOL0570</i> , Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
RN4220	Restriktion negativer Stamm, 8325 Derivat	Kreiswirth <i>et al.</i> , 1983
RN4220 <i>clpB</i>	RN4220, <i>clpB::tetL</i> , Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
RN4220 $\Delta clpL$	RN4220, <i>clpL::lox66-aphAIII-lox71</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
RN4220 $\Delta clpX$	RN4220, <i>clpX::lox66-aphAIII-lox71</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
RN4220 $\Delta clpY$	RN4220, <i>clpY::lox66-aphAIII-lox71</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
RN4220::pBT_SACOL0570 <sup>+</sup>	RN4220, pBT_SACOL0570 <sup>+</sup> , Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
RN4220::pEC1_SA0835 <sup>+</sup>	RN4220, pEC1_SA0835 <sup>+</sup> , Erm <sup>R</sup>	diese Arbeit
SH1000	8325-4 Derivat, <i>rsbU</i> <sup>+</sup>	Horsburgh <i>et al.</i> , 2002
SH1000 <i>clpC</i>	SH1000, <i>clpC::ermB</i> , Erm <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	$\Delta(lac)U169$ , <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>hsdR17</i> , $\Phi 80\Delta(lacZ)M15$ , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

**Tab. 2.2: Verwendete eukaryote Zelllinien**

Zelllinie	relevante Merkmale	Referenz
EA.hy926	Fusion von primären humanen Nabelschnurzellen mit Zellen einer humanen Carcinom-Zelllinie A549/8, ATCC-CRL-2922, endotheliale humane Zelllinie, immortalisiert	Edgell <i>et al.</i> , 1983
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes, epitheliale humane Zelllinie, aus primärem malignen Melanom der oberen Rückenhaut eines 62-jährigen Patienten isoliert, immortalisiert	Breitkreutz <i>et al.</i> , 1993

## 2.2 Plasmide

**Tab. 2.3: Verwendete Plasmide**

Plasmid / Vektor	relevante Merkmale	Referenz
pBT	ColE1, Tet <sup>R</sup>	Giachino <i>et al.</i> , 2001
pBT_clpB´	ColE1, Tet <sup>R</sup> , pBT mit 895 bp <i>KpnI-EcoRI-clpB´</i> Fragment	diese Arbeit
pBT_SACOL0570´	ColE1, Tet <sup>R</sup> , pBT mit 1015 bp <i>KpnI-XhoI-SACOL0570´</i> Fragment	diese Arbeit
pBT_SACOL2563up	ColE1, Tet <sup>R</sup> , pBT mit 723 bp <i>XhoI-KpnI-SACOL2563up</i> Fragment	diese Arbeit
pBT_SACOL2563up_down	ColE1, Tet <sup>R</sup> , pBT_SACOL2563up, mit 953 bp <i>BamHI-SacI-SACOL2563down</i> Fragment	diese Arbeit
pBT_SACOL2563up_aph-lox_down	ColE1, Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , pBT_SACOL2563up_down mit 1555 bp <i>BamHI-XhoI-lox66-aphAIII-lox71</i> Fragment	diese Arbeit



pBT_SACOL1721up	ColE1, Tet <sup>R</sup> , pBT mit 997 bp <i>XhoI-KpnI-SACOL1721up</i> Fragment	diese Arbeit
pBT_SACOL1721up_down	ColE1, Tet <sup>R</sup> , pBT_SACOL1721up mit 1046 bp <i>BamHI-SacI-</i> <i>SACOL1721down</i> Fragment	diese Arbeit
pBT_SACOL1721up_aph-lox_down	ColE1, Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , pBT_SACOL1721up_down mit 1555 bp <i>BamHI-XhoI-lox66-aphAIII-lox71</i> Fragment	diese Arbeit
pBT_SACOL1271up	ColE1, Tet <sup>R</sup> , pBT mit 817 bp <i>XhoI-KpnI-SACOL1271up</i> Fragment	diese Arbeit
pBT_SACOL1271up_down	ColE1, Tet <sup>R</sup> , pBT_SACOL1271up mit 946 bp <i>BamHI-SacI-</i> <i>SACOL1271down</i> Fragment	diese Arbeit
pBT_SACOL1271up_aph-lox_down	ColE1, Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , pBT_SACOL1271up_down mit 1555 bp <i>BamHI-XhoI-lox66-aphAIII-lox71</i> Fragment	diese Arbeit
pEC1	ColE1, Amp <sup>R</sup> , Erm <sup>R</sup>	Brückner, 1997
pEC1_SA0835´	ColE1, Amp <sup>R</sup> , Erm <sup>R</sup> , pEC1 mit 1208 bp <i>KpnI-BamHI-SA0835´</i> Fragment	diese Arbeit

## 2.3 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg bezogen. Sie dienten der Konstruktion, Verifizierung und Sequenzierung der Vektoren (Tab. 2.3). Oligonukleotid-Stammlösungen wurden in einer Konzentration von 100 pmol/μl in H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub> hergestellt. Gebrauchslösungen wurden durch 1:10 Verdünnung der Stammlösung in H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub> hergestellt. Die 1:20 Verdünnung der für die Real-Time PCR verwendeten Primer erfolgte in LiChroslov® Wasser (Merck, Darmstadt). Die Lagerung der Stamm- und Gebrauchslösungen erfolgte bei -20°C. Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der jeweiligen PCR-Produkte wurden unterstrichen.

**Tab. 2.4: Verwendete Oligonukleotide zur Konstruktion der Vektoren für die Erzeugung der *clp*-Mutanten sowie der Komplementation der Insertionsmutanten und deren Nachweis der Integration in *S. aureus*.**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
aph int-	CCAATTCTCGTTTTCATACCTC	-
clpB+	GCAGTTGAACTGAGTCAGC	-
clpB ia +	GTCGGTACCGTATGCATCTGTAGAAGGTG	KpnI
clpB ia -	GTCGAATTCTATCTTGAATACGCACACC	EcoRI
ermB rev	CTCCTCCCGTTAAATAATAGATAAC	-
M13 rev	GGAAACAGCTATGACCATG	-
MCIpCForw	ATATGGATCCTG TAGAATGATAACTATG	BamHI
	GAAGAGG	
MCIpCRev	ATATGGATCCCAAATTCACCACGATATTT	BamHI
	AGTACC	
SACOL0570 compl. +	GTCGGTACCGGATTACTTATTTCTGTTATGG	KpnI
SACOL0570 compl. -	GGTCTCGAGATTCTAATTTTGTATGTCTTGATTG	XhoI
SA0835 compl +	GTCGGTACCGAAGAAATTGGCGATATTGTC	KpnI
SA0835 compl -	CTCGGATCCAGATAGTGATTACAATATTTCTG	BamHI
SACOL1271up+	GTCGGTACCATGAGTAATAACAATTACATGC	KpnI
SACOL1271up-	GTCCTCGAGTTTTACCAACGCCGTTGG	XhoI
SACOL1271do+	GTCGGATCCAAGTATGCCGAATGCAGTTG	BamHI
SACOL1271do-	GTCGAGCTCATCGTCACGACTAGGACATTG	SacI
SACOL1271 reg up +	CATCCCCACAAGCTCAGACA	-
SACOL1721up+	CTCGGTACCTTGCTCTCTTAGTGCAACAT	KpnI
SACOL clpX up -	GGTCTCGAGATGTGTTATAAAAGTGAAAAGC	XhoI
SACOL1721do+	CTCGGATCCACCCCTATTCGTTAAAGACTA	BamHI
SACOL1721do-	GGTGAGCTCTGATGATGAGTTACAAGAAG	SacI
SACOL1721 reg up +	CGTCCCCCACTTTTACTTCTG	-
SACOL2563up+	CTCGGTACCTTTATACGTTACGGCTTCG	KpnI
SACOL2563up-	GGTCTCGAGATTGGTTTACAAAGTAAGAGG	XhoI
SACOL2563do+	CTCGGATCCATATCGCGCATCAAAAATGAGC	BamHI
SACOL2563do-	GGTGAGCTCATGTCATGCTCTGCTAGAC	SacI
SACOL2563 reg up+	CATCACTCAAAAGTTCCAATCGTC	-

**Tab. 2.5: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung der Vektoren für die Konstruktion der *clp*-Deletionsmutanten**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
aph int +	CTTTTCTGAAGTACATCCGC	-
aph int -	CCAATTCTCGTTTTCATACCTC	-
M13 uni	GTAAAACGACGGCCAG	-

M13 rev.	CAGGAAACAGCTATGAC	-
----------	-------------------	---

**Tab. 2.6: Verwendete Oligonukleotide für die Real-Time PCR**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
acnA +	CAAGATCATCAAGTGCCTATTCGT
acnA -	CGTGATTACCACGTCTTGAACC
asp23 f1	CAAGAACAAAATCAAGAGCCTCAAT
asp23 r1	CTTCACGTGCAGCGATACCA
clpB +	CGTGAAGTTGTAAACAGACGAA
clpB -	TTGAAACTGGTATGCCTGTCCA
clpC III +	CACCTAGAGCTAAAAAAGTCATTGAATTAT
clpCIII -	CAAAATTGTGATGTAATTTTCTAGCTTCAT
clpL II +	GAAGAAAAAGATATTATGCACGAAATGA
clpL II -	TAAGGAATTCAGGGCGGAAGA
clpX +	CCAAGACGTTGAATGTACCATTG
clpX -	CAGTTAACTTGTGCATCTGCA
clpY +	AGATCCTGGTGCCTTAGGTATGCT
clpY -	TGCATTTGCTGATTTTGATTGT
ctsR for	TGAACATGGTTATGAAATCGAAAG
ctsR rev	AGCAAATGATTAATATAACCTGTT
gyrB for	GACTGATGCCGATGTGGA
gyrB rev	AACGGTGGCTGTGCAATA
hla for	AACCCGGTATATGGCAATCAACT
hla rev	CTGCTGCTTTCATAGAGCCATT
RNAIII for	AGGAGTGATTTCAATGGCACAAG
RNAIII rev	TGTGTCGATAATCCATTTTACTAAGTC
sarA for	TCAATGGTCACTTATGCTGACAAA
sarA rev	TCAATACAGCGAATTCTTCAAAGC
spa for	TGCTGACAAAATTGCTGCAGATA
spa rev	GCATGGTTTGCTGGTTGCTT

## 2.4 Antibiotika

In Tabelle 2.7 sind alle verwendeten Antibiotika aufgelistet. Alle für Bakterien verwendeten Stammlösungen wurden nach Ansetzen bei -20°C gelagert. Die für die Kultivierung eukaryoter Zelllinien eingesetzten Antibiotika wurden gebrauchsfertig von den angegebenen Firmen bezogen und den Angaben entsprechend gelagert.

**Tab. 2.7: Verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Lösungsmittel, Firma	eingesetzte Konzentration
für Bakterien		
Ampicillin	H <sub>2</sub> O <sub>mill</sub> , Roth, Karlsruhe	100 µg/ml bei <i>E. coli</i>
Erythromycin	70% EtOH, Fluka, Buchs, Schweiz	20 µg/ml bei <i>S. aureus</i>
Kanamycin	H <sub>2</sub> O <sub>mill</sub> , Roth, Karlsruhe	50 µg/ml bei <i>E. coli</i> & <i>S. aureus</i>
Tetracyclin	70% EtOH, Sigma, Steinheim	8 µg/ml bei <i>E. coli</i> & <i>S. aureus</i>
für eukaryote Zelllinien		
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin	100 µg/ml bei HaCaT & EA.hy
Refobacin (Gentamicin)	Merck KG, Darmstadt	100 µg/ml bei HaCaT & EA.hy

## 2.5 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien wurden als Fertigprodukte bezogen und laut Herstellerangaben in einer entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub> angesetzt und autoklaviert. Bei der Verwendung als Festmedium wurde 1,5% Agar zugesetzt. Die Nährmedien zur Kultivierung eukaryoter Zellen wurden als Basismedien von den angegebenen Firmen bezogen (Tab. 2.8).

**Tab. 2.8: Verwendete Nährmedien und Agar**

Nährmedium/ Agar	Hersteller
zur Kultivierung von Bakterien	
Agar	Bacto™, BD, Heidelberg
Trypticase™ Soy Agar II (TSA) + 5% Schafsblut (Schafsblutagar)	BD, Heidelberg
BHI	Bacto™, BD, Heidelberg
LB Broth, Lennox	Difco™, BD, Heidelberg
MHI Broth	Difco™, BD, Heidelberg
TSB Broth	Bacto™, BD, Heidelberg
zur Kultivierung eukaryoter Zelllinien	
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco®, Invitrogen, Darmstadt
MCDB153 Basal Medium	Biochrom AG, Berlin

## 2.6 Puffer

In Tabelle 2.9 sind die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer aufgelistet. Handelt es sich um gebrauchsfertige Puffer, sind die Firmen angegeben. Zu bestimmten Kits sowie Methoden gehörige Puffer sind unter Abschnitt 3 Methoden bei den jeweiligen Kits und Methoden aufgelistet.

**Tab. 2.9: Verwendete Puffer**

Puffer	Zusammensetzung/ Firma	
DNA-Probenpuffer (6-fach konzentriert)	Fermentas, St. Leon-Rot	
PBS (10-fach konzentriert) (eingesetzte Konzentration 1-fach)	NaCl	80 g/l
	KCl	2 g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	14,2 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,7 g/l
	pH 7,2, autoklavieren	
TBE (10-fach konzentriert) (eingesetzte Konzentration 0,5-fach)	Tris	108 g/l
	Borsäure	55 g/l
	Na <sub>2</sub> EDTA	9,3 g/l
	pH 8,3	
TE-Puffer (1-fach konzentriert)	Tris	1,21 g/l
	EDTA	0,37g/l
	pH 8,0, autoklavieren	

## 2.7 Enzyme

Tabelle 2.10 gibt eine Übersicht über die verwendeten Enzyme. Restriktionsenzyme sind in Tabelle 3.1 gesondert aufgeführt.

**Tab. 2.10: Verwendete Enzyme**

Enzym	Firma
DNaseI	Qiagen, Hilden
FastAP™	Fermentas, St. Leon-Rot
FastStart High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
hot-start Taq DNA-Polymerase	MP Biomedicals, Eschwege
Lysostaphin	Genmedics, Reutlingen

Lysozym	Qiagen, Hilden
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
QuantiTect reverse Transkriptase	Qiagen, Hilden
reverse Transkriptase	Peqlab Biotechnology, Erlangen
RNase A	Qiagen, Hilden
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin/ EDTA	PAA, Cölbe
Turbo DNase	Invitrogen, Darmstadt

## 2.8 Zentrifugen

**Tab. 2.11: Verwendete Zentrifugen**

Zentrifuge	Hersteller
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Sigma Laboratory Centrifuges 4 K 15	Fischer Scientific, Schwerte
Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Du Pont Instruments, Ringoes, USA
Tischzentrifuge Z 233 MK-2	Hermle Labortechnik GmbH, Gosheim

## 2.9 Sonstige Geräte

**Tab. 2.12: Sonstige Geräte**

Gerät	Hersteller
Colony Counter acoLyte	Synbiosis, Cambridge, UK
Countess™ automated cell counter	Invitrogen, Darmstadt
FACSCalibur	BD, Heidelberg
Fotokamera	Fuji FinePix F40
Gene Pulser, Pulse Controller, Capacity Extender	Bio Rad, München
LightCycler- Thermocycler 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikroskope	
Axiovert 10	Zeiss, Oberkochen
DMI4000 B	Leica, Wetzlar
Kamera DFC420 C	Leica, Wetzlar
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Karlsruhe
Photometer	
Helios	Thermo Scientific, Karlsruhe
GeneQuant pro	Biochom AG, Berlin
Ribolyser FastPrep FP120	ThermoSavant, Heidelberg
Thermocycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
Ultraschallgerät Labsonic 1510	B. Braun, Melsungen
Vitek Densicheck	Biomerieux, Marcy, Frankreich

Alle weiteren eingesetzten Laborgeräte sind im Text bei „3 Methoden“ aufgeführt.

## 2.10 Bezugsquellen

### 2.10.1 Verwendete Standards und Kits stammen von folgenden Firmen:

**Tab. 2.13: Verwendete Standards und Kits**

Standard/ Kit	Firma
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Modified Lowry Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe
Mycoplasmen-PCR-Detection Kit Venor® GeM	Minerva Biolabs, Berlin
NucleoSpin® RNA II Mini Kit	Machery-Nagel, Düren
Power Sybr Green Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Qia-Prep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
QiaQuick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNA protect	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy MiniElute Clean up Kit	Qiagen, Hilden
1 Kb DNA Ladder	Invitrogen, Darmstadt

### 2.10.2 Chemikalien wurden in Analyse-Qualität von folgenden Firmen bezogen:

Ambion, Woodward Austin, USA

Appllichem GmbH, Darmstadt

Carl-Roth GmbH, Karlsruhe

Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

Merck KG, Darmstadt

Otto NordWald, Hamburg

Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England

Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen

Qiagen, Hilden

Roth GmbH, Karlsruhe

SeaKem LE, Biozym, Rockland, USA

Serva Feinbiochemie GmbH & Co, Heidelberg

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### **2.10.3 Die verwendeten Einmal-Plastikwaren stammen von folgenden Firmen:**

Greiner, Frickenhausen

Eppendorf, Hamburg

Sarstedt, Nürnberg

### **2.11 Computerprogramme und Datenbanken**

Blast: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Gene search tool: <http://www.cmr.jcvi.org/tigr-scripts>

Microsoft® Office 2010

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

„R“ © 2011

SigmaPlot® 10, Copyright 2006 Systat Software, Inc.



## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung und Konservierung der verwendeten Bakterienstämme und eukaryoten Zelllinien

#### 3.1.1 Anzuchtbedingungen und Konservierung von *S. aureus* und *E. coli*

##### Anzucht auf Festmedien

Die Anzucht von *Staphylococcus aureus* auf Festmedium erfolgte auf Schafsblutagar und von *Escherichia coli* auf Luria Bertani (LB)-Agarplatten bei 37°C. Bei einem Wachstum unter Selektionsdruck, bei z.B. im Genom vorhandenen replikativen Plasmiden oder zur Selektion von Mutanten, wurden für beide Spezies LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika verwendet.

##### Kultivierung in Flüssigmedien

Zur Kultivierung der Bakterien in Flüssigmedium wurden zunächst über Nachtkulturen (üNK) mit einer Einzelkolonie auf Schafsblutagar beimpft. Falls nicht bei einer bestimmten Methode anders beschrieben, erfolgte von der üNK aus eine Inokulation der Hauptkultur mit einem Kultur- zu Kultivierungsgefäß-Verhältnis von 1:10 und einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,1. Für *S. aureus* wurden abhängig des weiteren Vorgehens die Medien Brain Heart Infusion (BHI), LB oder Trypticase Soy Broth (TSB) verwendet und bei 37°C und 150 rpm oder 230 rpm inkubiert. Für die Flüssiganzucht von *E. coli* wurde stets LB-Medium herangezogen und bei 150 rpm bei 37°C inkubiert. Für ein Wachstum unter Selektionsdruck wurde dem jeweiligen Medium eine entsprechende Menge eines Antibiotikums zugesetzt.

##### Cryokonservierung

Zur Cryokonservierung der Bakterien wurde eine üNK im Verhältnis 1:4 mit 99,5% Glycerin vermischt und bei -70°C gelagert.

#### 3.1.2 Auftauen, Kulturbedingungen, Passagierung und Konservierung eukaryoter Zellen

##### Auftauen

Für das Auftauen, die Kultivierung und Passagierung von EA.hy926-Zellen wurde stets DMEM-Vollmedium (DMEM mit 1% L-Glutamin (200 mM, Gibco, Darmstadt), 1% Penicillin/Streptomycin (Pen./Strep.) und 10% Fetal Bovine Serum Gold (FBS, PAA, Cölbe))

und für HaCaT-Zellen MCDB153-Vollmedium (MCDB153 mit 1% Pen./Strep., 1% NEM (Non Essential Amino Acids, Gibco, Darmstadt) und 10% FBS) verwendet. Das Auftauen beider eukaryoter Zelltypen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 10 ml vorgewärmtem Vollmedium in einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche (TPP, Trasadingen, Schweiz). Das Cryotube mit den eukaryoten Zellen wurde nach Entnahme aus dem Stickstofftank sorgfältig mit Freka®-Nol AF (Dr. Schumacher GmbH, Melsungen) besprüht, das Schraubgewinde zum Druckabbau leicht aufgedreht und anschließend gut verschlossen im 37°C Wasserbad aufgetaut. Nach erneutem sorgfältigem Desinfizieren des Tubes mit Freka®-Nol AF wurden die eukaryoten Zellen in die 10 ml Medium überführt, durch sanftes Schwenken verteilt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 4 Tage inkubiert. Zudem wurde direkt nach dem Auftauen mit 10 µl der eukaryoten Zellen eine Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung, unter Verwendung von 10 µl Trypanblau (0,5%, Biochrom AG, Berlin) durch einen Countess™ automated cell counter, durchgeführt.

#### Kultivierung und Passagierung

Die Kultivierung und Passagierung erfolgte in 10 ml Vollmedium in 60 cm<sup>2</sup> Kulturschalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Eine Passagierung erfolgte alle 3 bis 4 Tage, sobald die Zellen in der Kulturschale eine Konfluenz von ca. 90% aufwiesen. Hierfür wurden die Zellen stets durch Mikroskopie auf Konfluenz und Adhärenz überprüft. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, mit 1xPBS gewaschen und die Zellen durch 2 ml Trypsin-EDTA (T/E, 1:10 in H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub>) für ca. 20 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> abgelöst. Nach Zugabe von 2 ml Vollmedium erfolgte eine Überführung der abgelösten Zellen in ein 50 ml Greinertube und eine Zellzahl- sowie Viabilitätsbestimmung (wie unter „Auftauen“ beschrieben). Die eukaryoten Zellen wurden bei 1400 rpm und Raumtemperatur (RT) für 5 min pelletiert, das Medium abgesaugt und das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen (Vol.) an Vollmedium (3 ml pro anfangs verwendeter Kulturschale) resuspendiert. Es erfolgte eine Subkultivierung (1:3, 1:6 und 1:10) der eukaryoten Zellen in 10 ml frischem Vollmedium. Bis zur nächsten Passagierung wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zudem erfolgte in Abständen von ca. 4 bis 8 Wochen der Test der eukaryoten Zellkulturen auf Mycoplasmen mit dem Mycoplasmen-PCR-Detection Kit Venor® GeM von Minerva Biolabs, Berlin nach den Angaben des Herstellers.

### Cryokonservierung

Für die Cryokonservierung der eukaryoten Zellen wurden ca. zu 90% konfluente Zellen verwendet. Diese wurden, wie bereits für die Passagierung beschrieben, abtrypsiniert und das Zellpellet in ca. 6°C vorgekühltem Einfriermedium (10% DMSO (Serva, Heidelberg), 30% FBS und 60% Vollmedium) resuspendiert. Dabei wurde bei EA.hy926 eine Zellzahl von  $1,8 \cdot 10^6$  Zellen/ml und bei HaCaT eine Zellzahl von  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml eingestellt und davon 1 ml pro Cryotube abgefüllt. Nachdem die eukaryoten Zellen für ca. 24 Std. bei -70°C eingefroren waren, wurden sie in flüssigen Stickstoff zur dauerhaften Konservierung überführt. Dabei erfolgte die Zellzahlbestimmung wie unter „Auftauen“ erläutert.

## **3.2 Isolierung, Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren**

Die Bestimmung der Konzentration isolierter Nukleinsäuren erfolgte mittels NanoDrop 2000 von Thermo Scientific, Karlsruhe.

### **3.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus *S. aureus***

Zur Isolierung genomischer DNA aus *S. aureus* wurde ein Verfahren angewandt, das auf der Methode von Marmur [1961] basiert.

Für die Präparation wurden *S. aureus* Zellen wie unter Kapitel (Kap.) 3.1.1 beschrieben in BHI angezogen. Bei einer Zelldichte von ungefähr  $OD_{600}$  0,6 wurden die Zellen geerntet, indem sie in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 7500 rpm für 15 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Bakterienpellet in 2 ml 0,9% NaCl resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (ERG) überführt und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Bakterienpellets bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis wurden 180 µl 1xTE (Tris-EDTA)-Puffer zugegeben, das Pellet resuspendiert und danach 20 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) zugemischt. Das Reaktionsgefäß wurde in ein 37°C Wasserbad gestellt. Zur Lyse wurden 2 µl Lysozym (1 mg/ml) und 2 µl Lysostaphin (2 mg/ml) zugegeben, gemischt und zudem 200 µl warme 2% SDS-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde erneut gemischt und für ca. 10 min bei 37°C inkubiert. Nach sichtbarer Lyse wurden 100 µl warme Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) zugegeben und die Lösung invertiert. Nach einer weiteren Inkubation von 15 min bei 37°C wurde 1 Vol. TE-gesättigtes Phenol zugefügt und für 20 min geschüttelt. Der Ansatz wurde

für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, die wässrige Oberphase in ein neues ERG überführt und die Phenol Extraktion wiederholt. Nach dem erneuten Überführen der Oberphase in ein neues ERG wurde 1 Vol. mit TE-äquilibriertes Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und für 5 min geschüttelt. Danach wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und die Oberphase, welche nun die gereinigte DNA enthielt, in ein neues ERG überführt.

Zum Fällern der DNA wurden 2,5 Vol. eiskalter 99,9% EtOH (p.a.) zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach ca. 10 min Inkubation bei -20°C wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet 2-mal mit 70% EtOH (p.a.) gewaschen. Nachdem der EtOH vollständig, durch Auftupfen des ERG auf ein Saugtuch, abgeflossen war, wurde die DNA bei 37°C angetrocknet und in 100 µl 1xTE-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub> gelöst und anschließend bei -20°C gelagert.

### **3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. aureus* und *E. coli***

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung des Qia-Prep Spin Miniprep Kit von Qiagen, Hilden.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. aureus* wurden für die Lyse der Bakterienzellen nach Inkubation mit Puffer P1 2 µl Lysozym (1 mg/ml) und 2 µl Lysostaphin (2 mg/ml) zugegeben und für ca. 15 min bei 37°C inkubiert.

Die Lagerung der isolierten Plasmide erfolgte bei -20°C.

### **3.2.3 Isolierung, DNase-Verdau und Reinigung von Gesamt-RNA**

Bei allen Arbeiten mit RNA wurde zügig auf Eis gearbeitet, es wurden Handschuhe getragen und RNase freie Pipettenspitzen mit Filter verwendet, um eine Degradation mit RNasen zu verhindern. Zudem wurden Lösungen mit LiChroslov® Wasser angesetzt.

Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -70°C.

Für die Isolierung, den DNase-Verdau und die Aufreinigung von Gesamt-RNA wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Die erste beschriebene Methode (3.2.3.1) diente der Isolierung, dem DNase-Verdau und der Aufreinigung von Gesamt-RNA aus *S. aureus* Kulturen. Die zweite Methode (3.2.3.2) wurde für die Isolierung, den DNase-Verdau und die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus in EA.hy926-Zellen intrazellulär lokalisierten *S. aureus* genutzt.

### **3.2.3.1 Isolierung, DNase-Verdau und Reinigung von Gesamt-RNA aus in Kultur angezogenen *S. aureus***

Die Anzucht von *S. aureus* erfolgte wie unter Kap. 3.1.1 beschrieben in BHI bei 230 rpm. Anschließend wurde eine OD<sub>600</sub> von 2,0 verwendet, indem die gewollte optische Dichte von 2,0 durch die vorhandene OD<sub>600</sub> der Kultur dividiert wurde und die entsprechende Menge bei 5000 g für 5 min pelletiert. Die anschließende Isolierung, der DNase-Verdau und die Reinigung der Gesamt-RNA erfolgten unter Verwendung des NucleoSpin RNA II Mini Kit (Machery-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers. Zudem wurde auf den ersten DNase-Verdau folgend ein zweiter DNase-Verdau unter Verwendung der Turbo DNase (Invitrogen, Darmstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **3.2.3.2 Isolierung, DNase-Verdau und Reinigung von Gesamt-RNA aus in EA.hy926 intrazellulär lokalisierten *S. aureus***

Die genaue Methode zur Internalisierung und Persistenz von *S. aureus* in EA.hy926-Zellen kann Abschnitt 3.16 entnommen werden.

Um eine ausreichende Konzentration an Gesamt-RNA nach 1,30 Std. Internalisierung aber vor allem nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation von *S. aureus* isolieren zu können, wurden die eukaryoten Zellen mit aufgenommenen Bakterien von jeweils 5 wells einer 24-well Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) pro Zeitpunkt gepoolt.

Vor der Lyse der eukaryoten Zellen wurden diese mikroskopisch kontrolliert und zudem 100 µl Medium pro well entnommen und ausplattiert. Dadurch konnte eine eventuelle Verunreinigung, durch aus den eukaryoten Zellen ausgetretene Bakterien, nachgewiesen werden.

Zur Lyse wurde zunächst das Medium abgesaugt, jedes well mit 500 µl 1xPBS gewaschen, 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub> zupipettiert und die eukaryoten Zellen durch mehrmaliges Pipettieren lysiert. Anschließend wurden je 5 wells pro Zeitpunkt in ein 15 ml Greinertube gepoolt und 15 min bei 5600 rpm und 15°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das eukaryote Zellpellet in 1 ml 1xPBS resuspendiert und für 15 sec. per Ultraschall (50 Watt) gelöst. Im Anschluss wurden entsprechende Verdünnungen ausplattiert, um die Effizienz der Internalisierung und Persistenz detektieren zu können. Es wurden 2 ml „RNA protect“ zum Lysat gegeben, gut gemischt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 15°C

mit 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -70°C bis zur RNA-Isolierung gelagert.

Die Isolierung und der DNase-Verdau von Bakterien Gesamt-RNA erfolgten mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung der Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNeasy MiniElute Clean up Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.3 Ethanolpräzipitation

Mittels der Ethanolpräzipitation konnte sowohl DNA als auch RNA konzentriert werden.

Hierfür wurde eine DNA- oder RNA-Lösung zunächst mit 1/9 Vol. 3M Na-Acetat (pH 5,2) gemischt und anschließend mit 2,3 Vol. eiskaltem 99,99% EtOH (p.a.) versetzt. Der Ansatz wurde durch Invertieren gut gemischt und für mindestens 1 Std. bei -70°C gefällt. Nach dieser Inkubationszeit wurde für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das DNA- oder RNA-Pellet mit 200 µl 70%EtOH (p.a.) gewaschen, wonach für weitere 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert wurde. Nach vollständiger Entfernung des EtOH's wurde das Pellet für 5-10 min bei 37°C getrocknet und in einer entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub> gelöst. Die gelöste DNA wurde bei -20°C, die gelöste RNA bei -70°C aufbewahrt.

### 3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung von DNA Fragmenten. Aufgrund negativ geladener Phosphatgruppen bewegen sich Nukleinsäuren bei der Agarose-Gelelektrophorese nach Anlegen einer Spannung von der Kathode zur Anode. Dabei wandern auf den Agarose-Gelen größere Fragmente langsamer als kleine. Der Trennbereich kann zudem durch die Konzentration des Gels variiert werden.

In dieser Arbeit wurden stets 0,8% Agarosegele eingesetzt. Diese wurden durch das Lösen von Agarose durch Erhitzen in einem entsprechenden Volumen 0,5xTBE-Puffer hergestellt.

Zur Beladung des Gels wurden DNA-Lösungen mit 6x konzentriertem DNA-Probenpuffer versehen. Um die Banden der Nukleinsäuren auf dem Gel sichtbar zu machen, wurde dem DNA-Probenpuffer 1xSybrGold zugefügt, das in die DNA oder RNA interkaliert.

Darauf folgten das Sichtbarmachen der DNA Proben auf dem Gel durch die Bestrahlung mit UV-Licht durch einen Transilluminator und die Aufnahme des Gelbildes.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von ca. 100 Volt für ca. 45 min. Die Fragmentgrößen wurden durch Vergleich der Laufstrecken mit einem Größenstandard ermittelt.

Dazu wurden je 10 µl des 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen) mit 1xSybrGold auf das Gel aufgetragen.

### **3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Je nach Größe des zu amplifizierenden DNA-Stückes musste die Elongationszeit variiert werden. Auch die Annealing-Temperatur, bei der die Oligonukleotide an die komplementäre DNA-Sequenz binden, musste je nach Primer-Paar angepasst werden und lag in der Regel 5°C unter deren Schmelztemperatur.

Im Anschluss an eine PCR wurden die amplifizierten Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Größe hin untersucht und wenn sie im Anschluss zur Klonierung bestimmt waren, aufgereinigt.

Die PCR's wurden mit dem Fast Start High Fidelity PCR System von Roche, Mannheim nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **3.5.1 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Sollten PCR-Produkte oder Plasmide für eine DNA-Sequenzierung oder Klonierung verwendet werden, so mussten zuvor unerwünschte Bestandteile, wie DNA-Polymerase, dNTP's und Primer sowie Salze aus den PCR-Ansätzen oder Plasmiden nach einem Restriktionsverdau entfernt werden.

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden nach einem Restriktionsverdau erfolgte mittels QiaQuick PCR Purification Kit von Qiagen, Hilden nach Angaben des Herstellers.

### **3.6 Sequenzierung**

Zu sequenzierende DNA-Fragmente und Plasmide wurden laut Angaben des Auftragslabors nach Reutlingen an die 4baselab GmbH versendet und die Sequenzierungen dort durchgeführt.

## 3.7 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation

### 3.7.1 Restriktion

Zur Klonierung von PCR-Produkten in Plasmide war es notwendig, diese mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen zu verdauen. Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen von meist 4 oder mehr Basen und schneiden innerhalb dieser definierten Basenabfolge [Arber & Kinn, 1969]. Je nach eingesetztem Enzym entstehen dadurch überhängende („sticky ends“) oder glatte („blunt ends“) Enden.

Nach einem Restriktionsverdau des entsprechenden Plasmids und einem zu klonierenden PCR-Produkt mit denselben Enzymen konnten diese über die komplementären Enden mit Hilfe des Enzyms T4 DNA Ligase verbunden werden.

Nach jeder Restriktion wurden die Verdauungen auf Vollständigkeit mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. DNA-Fragmente, die anschließend zur Ligation eingesetzt werden sollten, wurden einer Aufreinigung mittels QiaQuick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, unterzogen.

Der Restriktionsansatz wurde nach Herstellerangaben angesetzt und inkubiert. Das Gesamtvolumen eines Restriktionsansatzes entsprach stets mindestens dem 10-fachen an eingesetztem Enzym.

Bei den verwendeten Restriktionsendonukleasen handelt es sich um FastDigest Enzyme von Fermentas. Diese sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

**Tab. 3.1: Verwendete Restriktionsenzyme.** Schnittstellen sind mit „▼“ gekennzeichnet.

Enzym	Erkennungssequenz (5' → 3')
BamHI	G▼GATCC
EcoRI	G▼AATTC
KpnI	GGTAC▼C
SacI	GAGCT▼C
XhoI	C▼TCGAG

### 3.7.2 Dephosphorylierung

Um nach einem Restriktionsverdau von Plasmid-DNA eine Re-Ligation der Enden zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung unter Verwendung des Enzyms FastAP™ von Fermentas, St. Leon-Rot, nach Herstellerangaben durchgeführt.



### 3.7.3 Ligation

Zur Ligation von PCR-Produkten und Plasmiden wurde das Enzym T4 DNA Ligase von Fermentas, St. Leon-Rot, eingesetzt. Es katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen freier Enden von DNA-Molekülen [Weiss *et al.*, 1968]. Das zu klonierende Fragment wurde in der Regel in 3-fachem Überschuss zur Vektor-DNA eingesetzt. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von maximal 10 µl.

## 3.8 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

Durch eine reverse Transkription lässt sich RNA unter Verwendung von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen sowie von spezifischen- oder random-Primern in cDNA (complementary DNA) umschreiben. Diese cDNA kann zum einen schon während ihrer Synthese durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert und in Transkriptomanalysen detektiert und quantifiziert werden. Zum anderen kann sie auch dazu dienen, die 5'-Enden von Transkripten zu bestimmen oder wie in dieser Arbeit dazu genutzt werden, um in einer nachfolgenden Real-Time PCR amplifiziert und somit detektiert bzw. quantifiziert zu werden.

Die zur Real-Time (RT)-PCR eingesetzte Gesamt-RNA wurde wie unter 3.2.3 beschrieben isoliert, aufgereinigt, DNase verdaut und auf ihre Konzentration hin untersucht.

Zur reversen Transkription von Gesamt-RNA aus in Kultur angezogenen *S. aureus* wurde der High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems, Darmstadt und für die reverse Transkription von Gesamt-RNA aus in EA.hy926-Zellen intrazellulär lokalisierten *S. aureus* der QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen, Hilden verwendet. Der Reaktionsansatz und die Bedingungen erfolgten nach Herstellerangaben.

Die so hergestellte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt und konnte direkt in der nachfolgenden quantitativen Real-Time PCR weiter verwendet werden.

## 3.9 Quantitative Real-Time PCR

Zur Quantifizierung von einzelnen spezifischen Transkripten wurde eine Real-Time PCR unter Verwendung des ABI 7000, Applied Biosystems, Darmstadt, durchgeführt. Prinzipiell werden bei einer Real-Time PCR zuerst die aus den zu vergleichenden Stämmen stammenden Gesamt-RNA-Isolate in einer vorangestellten reversen Transkription in cDNA umgeschrieben.

In der Real-Time PCR wird mit genspezifischen Primern die cDNA des zu quantifizierenden Transkripts amplifiziert. Die Menge der amplifizierten DNA wird am Ende von jedem PCR-Zyklus durch Messung der Fluoreszenz des durch Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green mit der doppelsträngigen DNA entstehenden Komplexes bestimmt. Am Ende einer Real-Time PCR wird für das untersuchte Transkript ein Ct-Wert berechnet, welcher als der Wert oder die Zyklenzahl definiert ist, bei der das Fluoreszenzsignal eine definierte Detektionsgrenze überschreitet. Kleinere Ct-Werte bedeuten dabei höhere Konzentrationen des Transkripts und umgekehrt. Um eventuelle Mengenunterschiede der eingesetzten cDNAs auszugleichen, wurden die Ct-Werte der zu vergleichenden Transkripte der Zielgene gegen die Ct-Werte des Transkripts des „housekeeping“ Gens *gyrB*, dass für eine Topoisomerase II kodiert, normalisiert. Nach Durchlaufen der eingestellten Zyklenzahl wurde eine Schmelzkurven-Analyse des entstandenen PCR-Produkts durchgeführt, um eine Aussage über die Homogenität des Amplifikates zu treffen und eventuelle Verunreinigungen zu detektieren. Zudem wurden H<sub>2</sub>O-Kontrollen ohne cDNA-Template getestet, um Verunreinigungen in den einzelnen Komponenten und eine Dimerisierung der verwendeten Primer auszuschließen.

Die Anzucht der zu vergleichenden Stämme, die Gesamt-RNA Isolierung und Aufreinigung, der DNase-Verdau und die reverse Transkription wurden, wie unter 3.2.3 und 3.8 beschrieben, durchgeführt. Von der cDNA wurden entsprechende Verdünnungen in Li<sup>®</sup>Chroslov Wasser angefertigt und in der Real-Time PCR als Template eingesetzt.

Der in der Real-Time PCR eingesetzte Power Sybr Green Master Mix, Applied Biosystems, Darmstadt enthält neben dem interkalierenden Farbstoff SYBR Green Ex, eine DNA-Polymerase, dNTP's und Puffer-Komponenten.

Die Reaktionsansätze zur Real-Time PCR sind Tabelle 3.2 zu entnehmen. Von den zu vergleichenden Transkripten sowie von den cDNA-Mengenkontrollen wurden jeweils Duplikate pipettiert und zur Messung eingesetzt.

Die Proben in den 96-well-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) wurden für 1 min bei 2000 rpm zentrifugiert und anschließend für die Messung im ABI 7000 verwendet.

Die Temperaturbedingungen der Real-Time PCR sind unter dem Temperaturprofil aufgeführt.

Tab. 3.2: Reaktionsansatz zur RT-PCR

Komponente	Menge [ $\mu$ l]	Endkonzentration
Power Sybr Green Master Mix	12,5	2x
Primer 1	1,5	300 nM
Primer 2	1,5	300 nM
HPLC-H <sub>2</sub> O	7,0	
Template	2,5	10 nM

**Temperaturprofil:**

1. Denaturierung	95°C → 10 min	
2. Denaturierung	95°C → 15 sec	} 40 Zyklen
3. Primer-Annealing und Elongation	60°C → 1 min	
4. Schmelzkurve Schritt 1	95°C → 15 sec	
5. Schmelzkurve Schritt 2	60°C → 20 sec	
6. Schmelzkurve Schritt 3	95°C → 15 sec	
7. Kühlung		

Die Auswertung erfolgte durch Bildung der Mittelwerte aus den Duplikaten der Ct-Werte des Templates und der Gyrase (*gyrB*)-Mengenkontrolle. Anschließend wurde der Ct-Wert der Gyrase gegen den Ct-Wert des Zielgens normalisiert. Um schließlich die n-fache Veränderung der mRNA Expression des Zielgens relativ zur Gyrase zu ermitteln, wurde das  $2^{-\Delta Ct}$  berechnet, wobei  $\Delta Ct$  den Unterschied des Grenzwerts zwischen dem Zielgen und der Gyrase bezeichnet.

### 3.10 Transformation

Da weder *E. coli* noch *S. aureus* natürlich kompetent sind, müssen die Zellen vor der Transformation einer speziellen Behandlung unterzogen werden.

#### 3.10.1 Präparation kompetenter Zellen und Transformation von *E. coli*

##### 3.10.1.1 Präparation kompetenter Zellen von *E. coli*

Für die Präparation kompetenter Zellen von *E. coli* wurden 250 ml Medium A von einer üNK 1:100 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 24°C im Wasserbad schüttelnd inkubiert. Es folgte die Pelletierung der Bakterien in einem vorgekühlten Zentrifugenbecher bei 2500 g

für 10 min. Das somit erhaltene Bakterienpellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert und anschließend 10 min auf Eis gekühlt. Nach erneuter Zentrifugation, wie beschrieben, wurde das Pellet in 20 ml TB-Medium resuspendiert und danach 1,4 ml DMSO (Serva, Heidelberg) langsam durch Tropfen zugemischt. Zum Schluss wurden 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Die verwendeten Komponenten zur Herstellung der Medien für die Präparation kompetenter Zellen von *E. coli* wurden getrennt angesetzt, autoklaviert und nach dem Zusammenmischen erneut autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Zusammensetzung der Medien kann Tab. 3.3 entnommen werden.

**Tab. 3.3: Medien zur Präparation kompetenter Zellen von *E. coli***

Medium	Komponente	Menge/ Konzentration
Medium A	Bacto Trypton	10 g
	Hefeextrakt	2,5 g
	NaCl	5 M
	KCl	1 M
	MgCl <sub>2</sub>	1 M
	MgSO <sub>4</sub>	1 M
	auf 500 ml auffüllen, autoklavieren	
TB-Medium	PIPES	10 mM
	MnCl <sub>2</sub>	55 mM
	CaCl <sub>2</sub>	15 mM
	KCl	250 mM
	auf 250 ml auffüllen, sterilfiltrieren	

### 3.10.1.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente *E. coli*-Zellen schonend auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 100 bis 200 ng/µl oder 10 µl eines Ligationsansatzes gemischt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne DNA. Die Transformationsansätze wurden für 15 min auf Eis gehalten, anschließend zum Hitzeschock für 30 sec bei 42°C in ein Wasserbad gestellt und anschließend für 5 min auf Eis gehalten. Daraufhin wurden 900 µl SOC-Medium zugegeben, der Ansatz in Reagenzgläser überführt und für 1 Std. bei 37°C schüttelnd inkubiert, um die phänotypische Expression des Selektionsmarkers zu ermöglichen. Nach dieser Inkubationszeit wurden entsprechende

Verdünnungen des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der ausplattierten Transformanten erfolgte bei 37°C.

Die Transformationseffizienz wurde als KBE (Koloniebildende Einheiten) pro µg eingesetzter Plasmid-DNA, bzw. Vektor bestimmt.

Tabelle 3.4 kann die Zusammensetzung des SOC-Mediums entnommen werden. Die einzelnen Komponenten wurden zusammengemischt und autoklaviert. Erst danach wurde die Glucose zugefügt.

**Tab. 3.4: Zusammensetzung von SOC**

Komponente	Menge/ Konzentration
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
	Komponenten in 950 µl H <sub>2</sub> O <sub>mill</sub> lösen und danach restliche Komponenten zufügen
KCl	10 ml einer 250 mM Konzentration
MgCl <sub>2</sub>	5 ml einer 2 M Konzentration
	autoklavieren, danach Glucose zugeben
Glucose	20 mM (sterilfiltriert)

### 3.10.2 Präparation elektrokompenter Zellen und Elektroporation von *S. aureus*

#### 3.10.2.1 Präparation elektrokompenter Zellen von *S. aureus*

Für die Präparation elektrokompenter *S. aureus* wurden 25 ml B2-Medium mit einer *S. aureus* Kolonie auf Schafsblutagar beimpft und bei 150 rpm und 37°C inkubiert. Diese üNK wurde danach 1/25 in frischen 25 ml B2-Medium mit 0,5% Glucose verdünnt und weiter wie beschrieben inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 erfolgte eine Pelletierung der Bakterien bei 8000 rpm für 10 min. Die Zellen wurden in 25 ml H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub> resuspendiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Dieser Schritt wurde 3-mal wiederholt. Anschließend wurden die *S. aureus* Zellen in 1/5 Vol. 10% Glycerol gelöst, erneut bei 8000 rpm für 10 min zentrifugiert, in 1/10 Vol. Glycerol resuspendiert und für 15 min bei ca. 20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (8000 rpm für 10 min) wurden die Bakterienzellen in 800 µl 10% Glycerol

resuspendiert und 70 µl Aliquots entweder direkt zur Elektroporation genutzt oder nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert.

Die genaue Zusammensetzung des B2-Mediums kann Tab. 3.5 entnommen werden.

**Tab. 3.5: Zusammensetzung des B2-Mediums**

Komponente	Menge
Casein Hydrolase	5 g
Hefe	12,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6 g
NaCl	12,5 g
auf 500 ml auffüllen, autoklavieren	

### 3.10.2.2 Elektroporation von *S. aureus*

Für die Elektroporation mit Plasmid-DNA zum Zweck eines cross-overs in das Genom von *S. aureus* wurden frisch elektrokompente Zellen und ca. 1 µg an Plasmid-DNA verwendet. Im Fall der Elektroporation mit Plasmid-DNA, welche replikativ in *S. aureus* eingebracht werden sollte, konnten zuvor bei -70°C gelagerte Bakterienzellen verwendet werden und zudem waren ca. 500 ng an Plasmid-DNA ausreichend.

Zur Elektroporation wurden die elektrokompenten *S. aureus* Zellen mit Plasmid-DNA gemischt, der Ansatz in eine 0,1 cm Elektroporationsküvette (Bio Rad, München) überführt und bei 20°C, 100 Ohm, 25 µF und 2,3 kV elektroporiert (Bio Rad, München). Anschließend wurde der Ansatz in 390 µl bei 37°C vorgewärmtem B2-Medium mit 0,5% Glucose überführt und für 1 Std. unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 1 min bei 5000 g zentrifugiert und 100 µl auf Antibiotika-haltigem LB-Agar ausplattiert und bei 37°C für 1 bis 2 Tage inkubiert.

## 3.11 Phagentransduktion

Die Phagentransduktion wird in zwei aufeinander folgende Schritte eingeteilt. Bei dem ersten Schritt wird unter Verwendung von Bakteriophagen aus dem jeweiligen *S. aureus* Donor DNA isoliert. Bei dem zweiten Schritt wird diese von den Phagen aufgenommene DNA an den jeweiligen *S. aureus* Rezipient abgegeben. In dieser Arbeit wurde stets der Bakteriophage φ85 verwendet.

Im ersten Schritt wurde der Donor über Nacht (üN) in 20 ml LB-Medium bei 230 rpm und 37°C angezogen. Dieser Kultur wurden 100 µl einer 1 M CaCl<sub>2</sub> Lösung zugegeben. Nach Verdünnen des Phagenlysates in Phagenpuffer (LB-Medium mit 5 mM CaCl<sub>2</sub>) wurden 300 µl der üNK mit 100 µl des Phagenlysates gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden 4 ml auf 50°C temperierter LB-Softy (LB-Medium mit 0,6% Agar) mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> zugefügt und das Gemisch auf Schafsblutagar überführt. Nach einer Inkubation bei 37°C üN wurde diejenige Schafsblutagar-Platte zur Lysatherstellung verwendet, bei der zum einen die Phagenverdünnung zu einem Wachstum der Bakterien geführt hat, was an einer Braunfärbung des Blutagars erkennbar war und sich zum anderen eine transparente Schicht auf dem Blutagar gebildet hatte, was ein Zeichen für die Lyse der Bakterien durch die Phagen war. Darauf wurden 2 ml Phagenpuffer gegeben und die transparente Schicht mit Hilfe eines Pasteurspatels gekratzt und in ein ERG überführt. Nach Zentrifugation bei 9000 rpm für 10 min wurde der Phagen-haltige Überstand durch ein 0,2 µm Filter (Sarstedt, Nürnberg) filtriert und bei 4°C gelagert.

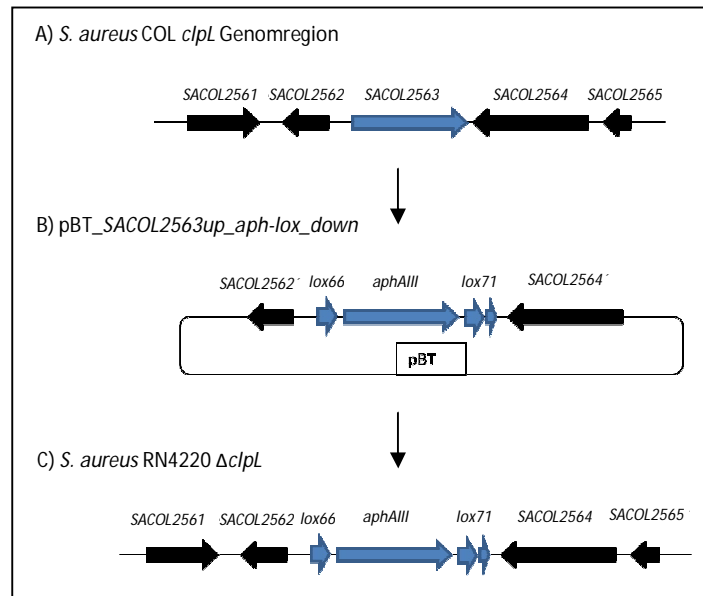
Bei dem zweiten Schritt handelt es sich um die Übertragung der Ziel-DNA durch die im ersten Schritt verwendeten Bakteriophagen vom *S. aureus* Donor zum Rezipienten. Die Durchführung erfolgte wie bereits unter dem ersten Schritt beschrieben, mit Ausnahme von CaCl<sub>2</sub> im LB-Softy und der Verwendung von LB-Agarplatten mit Antibiotikum zur Selektion auf genetisch veränderte *S. aureus* Isolate, an Stelle von Schafsblutagar.

### **3.12 Konstruktion verschiedener *clp*-Mutanten und Komplementation der *clpB*- und *clpC*-Insertionsmutanten**

#### **3.12.1 Konstruktion von *clp*-Deletionsmutanten**

Für die Deletion der *clp*-Gene *clpL* (SACOL2563), *clpX* (SACOL1721) und *clpY* (SACOL1271) in *S. aureus* DSM20231 wurde die von Leibig *et al.* [2008] beschriebene Methode angewandt. Bei der genetischen Modifizierung von Staphylokokken findet üblicherweise ein Ersatz des Gens von Interesse durch einen Antibiotika Resistenzmarker statt. Initial wird bei der Methode von Leibig *et al.* [2008], ein konventioneller Austausch des Zielgens durch z.B. Kan<sup>R</sup>, kodiert durch *aphAIII*, im Genom von *S. aureus* durchgeführt. Der Kanamycin-Resistenzmarker wird von so genannten *lox*-Seiten, *lox66* und *lox71*, flankiert. Dabei handelt es sich um spezifische Erkennungssequenzen für eine Cre-Rekombinase. Diese liegt auf dem

Plasmid pRAB1 kodiert und wird nach Transformation des Plasmids in *S. aureus* exprimiert. Cre katalysiert die Exzision des Resistenzmarkers, sodass lediglich ein kurzer *lox72*-Abschnitt von 34 bp anstelle des ursprünglichen Gens zurück bleibt. Bei pRAB1 handelt es sich um ein Temperatur-sensitives Plasmid, das bei einer Temperaturerhöhung von 30°C auf 42°C nicht mehr replizieren kann. Mit dieser Technik ist die Konstruktion von markerlosen Deletionsmutanten von *S. aureus* möglich.



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Konstruktion von  $\Delta clpL$ ,  $\Delta clpX$  und  $\Delta clpY$  durch *lox66-aphAIII-lox71* in *S. aureus* RN4220 am Beispiel von  $\Delta clpL$ .** A) *S. aureus* COL Genomregion von *clpL*. B) Konstruktion von pBT\_*SACOL2563up\_aph-lox\_down* durch Klonierung der *lox66-aphAIII-lox71* Kassette mit den flankierenden Fragmenten *SACOL2563up* (*SACOL2562'*) und *SACOL2563down* (*SACOL2564'*) in pBT. C) Elektroporation von pBT\_*SACOL2563up\_aph-lox\_down* in *S. aureus* RN4220.

In einem ersten Schritt (Abb. 3.1 A) erfolgte eine Amplifizierung der up- und downstream des jeweiligen Zielgens (*clpL*, *X* und *Y*) gelegenen Bereiche unter Verwendung genomischer DNA von *S. aureus* N315, für *clpL* mit den Primern *SACOL2563up+* und - sowie *SACOL2563do+* und -, für *clpX* mit *SACOL1721up+* und *SACOL clpX up-* sowie *SACOL1721do+* und - und für *clpY* mit den Primerpaaren *SACOL1271up+* und - sowie *SACOL1271do+* und -. Die daraus erhaltenen PCR-up-Fragmente wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI (Tab. 3.1) verdaut und hatten eine Größe von 725 bp im Fall von *SACOL2563up*, 996 bp bei *SACOL1721up* und 817 bp bei *SACOL1271up*.



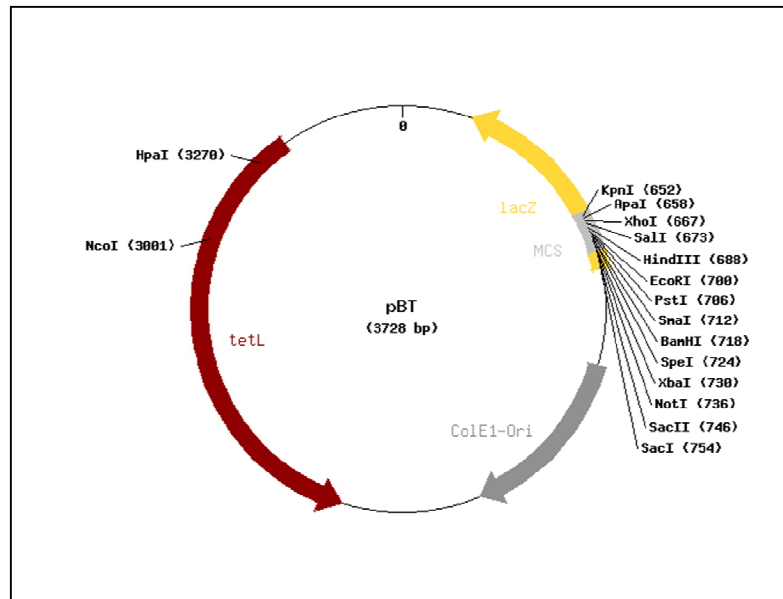


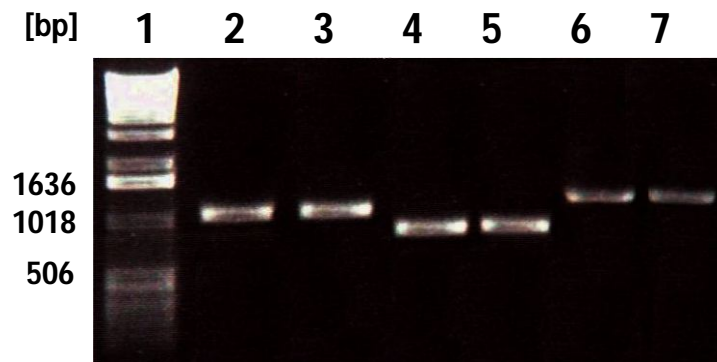
Abb. 3.2: Klonierungsvektor pBT mit Restriktionsschnittstellen (Tab. 2.3)

Nach Restriktionsverdau des Klonierungsvektors pBT (Abb. 3.2, Tab. 2.3) mit KpnI und XhoI (3713 bp) konnten die up-Fragmente in den Vektor ligiert werden. Nach Transformation in *E. coli* DH5α erfolgte eine Selektion der Transformanten auf Anwesenheit des Vektor pBT mit 8 µg/ml Tetrazyklin bei 37°C und nach Präparation der Plasmide durch einen Kontrollverdau mit KpnI und XhoI der Test auf in pBT enthaltene up-Fragmente, pBT\_SACOL2563up, pBT\_SACOL1721up und pBT\_SACOL1271up (Tab. 2.3).

Die PCR-down-Produkte, mit einer Größe von 953 bp bei SACOL2563down, im Fall von SACOL1721down 1046 bp und bei SACOL1271down ca. 946 bp nach dem Verdau, wurden dementsprechend über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SacI in pBT\_SACOL2563up, pBT\_SACOL1721up und pBT\_SACOL1271up kloniert. Die Selektion der Transformanten erfolgte ebenfalls auf LB-Agar mit 8 µg/ml Tetrazyclin und die Plasmide pBT mit bereits klonierten up-Fragmenten wurden über einen Kontrollverdau mit BamHI und SacI auf das Vorhandensein des jeweiligen down-Fragments hin getestet, pBT\_SACOL2563up\_down, pBT\_SACOL1721up\_down und pBT\_SACOL1271up\_down (Tab. 2.3). Anschließend wurde das 1555 bp lox66-aphAIII-lox71-Fragment über die Schnittstellen BamHI und XhoI unmittelbar zwischen die up- und down-Fragmente ligiert. Die Selektion der *E. coli* DH5α Transformanten erfolgte auf LB-Agar mit 50 µg/ml Kanamycin bei 37°C und der Kontrollverdau der Plasmide auf die Anwesenheit von lox66-aphAIII-lox71 mit BamHI und XhoI. Die somit erzeugten Plasmide wurden per Sequenzierung bei der 4baselab GmbH in Reutlingen unter Verwendung der in Tab. 2.5 aufgelisteten Oligonukleotide auf eine korrekte Basenabfolge

der in pBT klonierten Fragmente hin überprüft und mit pBT\_SACOL2563up\_aph-lox\_down, pBT\_SACOL1721up\_aph-lox\_down und pBT\_SACOL1271up\_aph-lox\_down bezeichnet (Tab. 2.3, Abb. 3.1 B).

Anschließend wurde das restriktions-negative *S. aureus* Isolat RN4220 mit diesen Vektoren per Elektroporation transformiert. Das Ziel war eine homologe Rekombination über die beiden Fragmente up und down, was in einer Deletion bzw. einem Austausch des jeweiligen Zielgens gegen *lox66-aphAIII-lox71* resultierte. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit 50 µg/ml Kanamycin bei 37°C. Die auftretenden Transformanten wurden anschließend erneut auf 50 µg/ml Kanamycin und zusätzlich auf 8 µg/ml Tetrazyclin bei 37°C überimpft. Das Wachstum sowohl auf Kanamycin als auch Tetrazyclin war ein Hinweis auf ein single-crossover, d.h. der homologen Rekombination über lediglich eines der Fragmente up oder down in das Genom von *S. aureus* RN4220. Aus Klonen, die kein Wachstum auf Tetrazyclin, aber auf Kanamycin aufwiesen, wurde genomische DNA isoliert, um eine tatsächliche Integration der *aph-lox*-Kassette in das Genom von RN4220 nachweisen zu können. Unter Verwendung je eines Primers auf der *aph-lox*-Kassette (*aph* int-, Tab. 2.4) und eines Primers auf dem Genom von RN4220 (SACOL2563 reg up +, SACOL1721 reg up + und SACOL1271 reg up +, Tab. 2.4) konnte eine korrekte Integration von *lox66-aphAIII-lox71* mittels PCR und damit die Deletion von *clpL*, *clpX* und *clpY* aufgezeigt werden. Es ergaben sich im Fall einer korrekten Integration PCR-Produkte bei einer Deletion von *clpL* von 991 bp, bei *clpX* von 1374 bp und bei einer *clpY*-Deletion von 1159 bp, wobei die PCR in Duplikaten pro isolierter DNA angesetzt wurde (Abb. 3.3). Die erzeugten Mutanten RN4220  $\Delta clpL$ , RN4220  $\Delta clpX$  und RN4220  $\Delta clpY$  (Tab. 2.1, Abb. 3.1 C) wurden als Donor-Stämme dazu verwendet, Phagenlysate herzustellen und die jeweilige *clp*-Deletion in *S. aureus* DSM20231 einzubringen. Die Selektion der DSM20231 *clp*-Mutanten erfolgte mit 50 µg/ml Kanamycin bei 37°C. Von den entstandenen Kolonien wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels Real-Time PCR unter Verwendung der RT-Primerpaare *clpL* II + und *clpL* II -, *clpX* + und *clpX* - und *clpY* + und *clpY* - (Tab. 2.6) auf ein Verlust des *clpL*, *clpX* oder *clpY* Transkripts hin überprüft. Bei allen getesteten Klonen war jedoch eine Transkription von *clpL*, *clpX* oder *clpY* in Höhe des Wildtyps (WT) vorhanden. Auch nach weiterer Phagentransduktion und Test der entstandenen Kolonien mittels PCR und RT-PCR konnten keine DSM20231  $\Delta clpL$ , DSM20231  $\Delta clpX$  und DSM20231  $\Delta clpY$  Mutanten konstruiert werden.

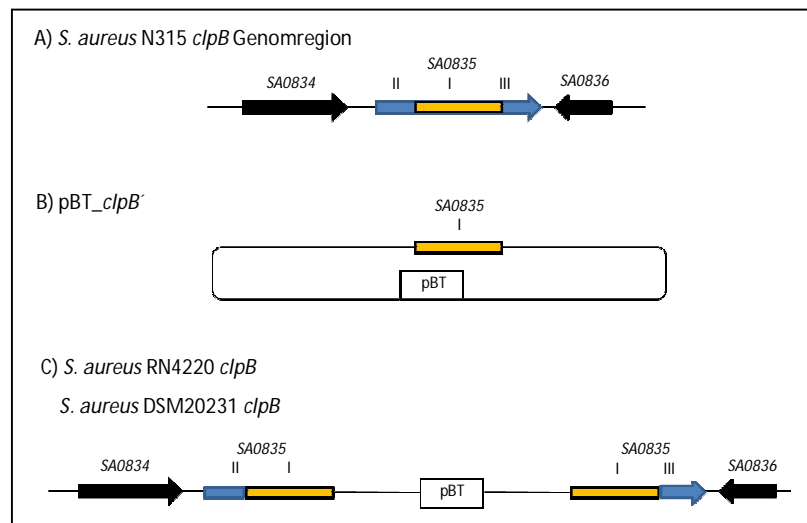


**Abb. 3.3:** Agarosegel zum Nachweis der korrekten Integration von *lox66-aphAIII-lox72* ins Genom von *S. aureus* RN4220 anstelle von *clpL*, *clpX* und *clpY*. Spur 1: 1 Kb Ladder; Spuren 2 und 3: PCR-Produkte auf genomischer DNA einer RN4220  $\Delta clpY$ -Transformante mit dem Primerpaar aph int - und SACOL1271 reg up + (1159 bp); Spuren 4 und 5: PCR-Produkte auf genomischer DNA einer RN4220  $\Delta clpL$ -Transformante mit dem Primerpaar aph int - und SACOL2563 reg up + (991 bp); Spuren 6 und 7: PCR-Produkte auf genomischer DNA einer RN4220  $\Delta clpX$ -Transformante mit dem Primerpaar aph int - und SACOL1721 reg up + (1374 bp).

### 3.12.2 Konstruktion der *clpB*-Insertionsmutante

Für die Konstruktion der *clpB* (SA0835)-Insertionsmutante wurde zunächst ein 895 bp großes Fragment *clpB'* unter Verwendung genomischer DNA aus *S. aureus* N315 amplifiziert (Abb. 3.4 A). Dem daraus entstandenen *clpB'*-Fragment wurde zudem durch das verwendete Primerpaar ClpB ia+ und ClpB ia- (Tab. 2.4) eine KpnI- und EcoRI- Schnittstelle angefügt. Nach einem Restriktionsverdau des PCR-Produktes und dem verwendeten Vektor pBT (Abb. 3.2) konnte das *clpB*-Fragment in pBT kloniert werden. Die Selektion nach der Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit pBT-*clpB'* (Tab. 2.3, Abb. 3.4 B) erfolgte mit 8  $\mu$ g/ml Tetrazyclin bei 37°C. Nach der Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5 $\alpha$  und einem Kontrollverdau unter Verwendung der Restriktionsenzyme KpnI und EcoRI (Tab. 3.1) wurde *S. aureus* RN4220 mittels Elektroporation mit dem Vektor pBT-*clpB'* transformiert. Die Selektion auf Mutanten bei denen eine homologe Rekombination über das *clpB'*-Fragment in das Genom von RN4220 und damit eine Insertion von *clpB* durch den Vektor pBT, stattgefunden hat (RN4220 *clpB*, Tab. 2.1, Abb. 3.4 C), erfolgte durch 8  $\mu$ g/ml Tetrazyclin. Anschließend wurde die *clpB*-Insertion mittels Phagentransduktion in *S. aureus* DSM20231 überführt. Der Nachweis der Insertion von *clpB* im Genom von DSM20231 wurde unter Verwendung des RT-Primerpaares clpB+ und clpB- (Tab. 2.6) in einer RT-PCR durchgeführt. Im Vergleich zur *clpB* Transkription des Wildtyp lag die Transkription von *clpB* bei DSM20231 *clpB* (Tab. 2.1, Abb. 3.4 C) unter dem Detektionslimit. Anhand einer Pulse-Field Gelelektrophorese, die freundlicherweise von der Abteilung Diagnostik des „Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene“,

Homburg/ Saar durchgeführt wurde, konnte zudem aufgezeigt werden, dass sich die *clpB*-Insertionsmutation tatsächlich in dem Stamm DSM20231 befindet.



**Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Konstruktion der *clpB*-Insertionsmutante von *S. aureus* RN4220 und DSM20231. A) *S. aureus* N315 Genomregion von *clpB*. B) Konstruktion von pBT\_*clpB* durch Klonierung des *clpB*-Fragments in pBT. C) Elektroporation von pBT\_*clpB* in *S. aureus* RN4220.**

### 3.12.3 Erzeugung weiterer *clpC*-Insertionsmutanten mittels Phagentransduktion

Weitere in dieser Arbeit verwendete *S. aureus clpC*-Mutanten LS1 *clpC*, Newman T.F. *clpC*, SH1000 *clpC* und DSM136 *clpC* (Tab. 2.1) wurden durch Phagentransduktion erzeugt. Als Donor-Stamm diente stets PBM001 (DSM20231 *clpC*) und die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit 20 µg/ml Erythromycin bei 37°C.

Zum Nachweis der Insertion von *clpC* im Genom von LS1, Newman T.F., SH1000 und DSM136 wurde unter Verwendung des RT-Primerpaares *clpC* III + und *clpC* III - (Tab. 2.6) eine RT-PCR durchgeführt. Im Vergleich zur *clpC* Transkription der Wildtypen bzw. DSM136 lag die Transkription von *clpC* bei den Insertionsmutanten unter dem Detektionslimit.

### 3.12.4 Komplementation der *clpB*- und *clpC*-Insertionsmutanten

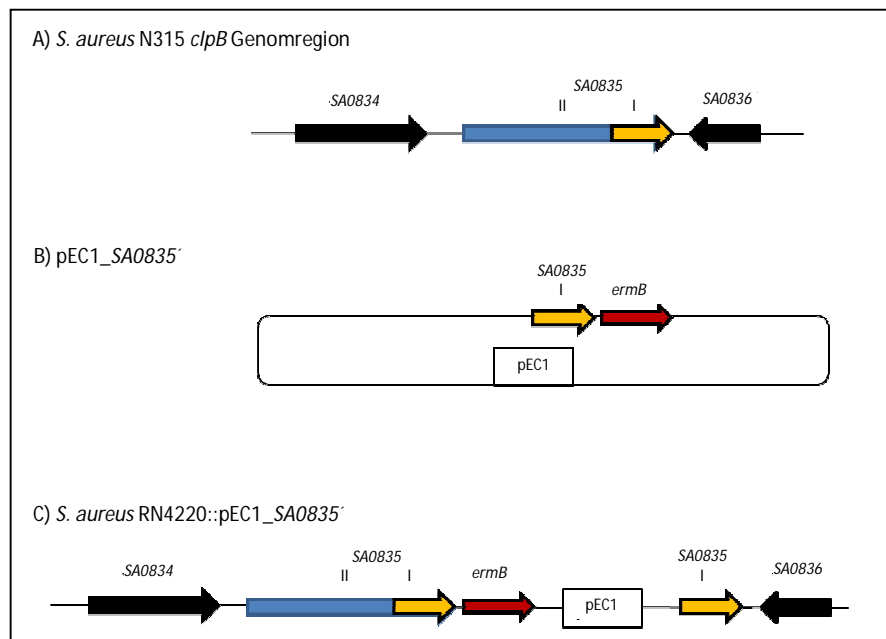
Die *clpB*- und *clpC*-Insertionsmutanten wurden *cis*-komplementiert. D.h. die genetischen Insertionen wurden in dem Genom von DSM20231 selbst korrigiert und nicht etwa durch Einbringen eines Plasmids, welches eine Kopie des jeweiligen Genes trägt. Die Vorteile im Gegensatz zur *trans*-Komplementation sind zum Einen, dass Experimente mit den Komplementanten nicht unter ständigem Selektionsdruck durchgeführt werden müssen und

zum Anderen entfallen Schwankungen in der Expression, die bei Plasmiden durch eine schwankende Kopienzahl auftreten können.

Für die Komplementation von DSM20231 *clpB*, PBM001 (DSM20231 *clpC*) und Newman T.F. *clpC* wurde in einem ersten Schritt ein 1208 bp *clpB*<sup>-</sup>-Fragment und ein 1015 bp *clpC*<sup>-</sup>-Fragment auf Grundlage von *S. aureus* N315 DNA amplifiziert. Die hierzu verwendeten Primerpaare SA0835compl. + und SA0835compl. - sowie SACOL0570compl. + und SACOL0570compl. - (Tab. 2.4) wurden so gewählt, dass jeweils der hintere Teil des Gens inklusive Stoppkodon amplifiziert wurde (Abb. 3.5 A). Anschließend erfolgte die Klonierung des *clpB*<sup>-</sup> PCR-Produkt über die beiden Restriktionsschnittstellen BamHI und KpnI in den Vektor pEC1 (Tab. 2.3) und des *clpC*<sup>-</sup> PCR-Produkt über KpnI und XhoI in den Vektor pBT (Tab. 2.3, Abb. 3.5 B). Im Anschluss an die Transformation erfolgte eine Selektion im Falle von *E. coli* DH5α (pEC1\_SA0835<sup>-</sup>) durch 100 µg/ml Ampicillin und bei *E. coli* DH5α (pBT\_SACOL0570<sup>-</sup>) unter Verwendung von 8 µg/ml Tetrazyclin bei 37°C. Nach einer Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5α mit darauf folgendem Kontrollverdau wurde das *S. aureus* Isolat RN4220 mittels Elektroporation mit den Plasmid-Konstrukten transformiert. Durch homologe Rekombination der Vektoren über das jeweilige Fragment *clpB*<sup>-</sup> oder *clpC*<sup>-</sup> konnte eine Integration der Plasmide in das Genom erreicht werden, bei der die intakten offenen Leseraster von *clpB* und *clpC* mit den Resistenzkassetten *ermB* bzw. *tetL* fusioniert wurden (Abb. 3.5 C). Die Selektion von RN4220 *clpB/clpB*<sup>+</sup> Transformanten erfolgte durch 20 µg/ml Erythromycin und der RN4220 *clpC/clpC*<sup>+</sup> (Tab. 2.1) Transformanten anhand von 8 µg/ml Tetracyclin bei 37°C. Danach konnten die *clpB-ermB* und *clpC-tetL* Regionen mittels Phagentransduktion in die jeweiligen DSM20231 Mutanten, bzw. Newman T.F. *clpC*-Mutante überführt werden um dort die entsprechenden Mutationen zu ersetzen. Die Selektion erfolgte wie bereits für RN4220 beschrieben.

Der Nachweis der Komplementation von *clpB* im Genom von DSM20231 *clpB* und von *clpC* im Genom von PBM001 und Newman T.F. *clpC* wurde unter Verwendung des RT-Primerpaars *clpB* +, *clpB* - und *clpC* III +, *clpC* III - in einer RT-PCR durchgeführt. Die Transkription der komplementierten Gene lag dabei im Bereich des jeweiligen WT. Zudem konnte anhand einer Pulse-Field Gelelektrophorese, die freundlicherweise von der Abteilung Diagnostik des „Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene“, Homburg/Saar durchgeführt wurde, aufgezeigt werden, dass sich die *clpB*- und *clpC*-Komplementationen tatsächlich in dem

genetischen Hintergrund des Stammes DSM20231, bzw. die *clpC*-Komplementation in Newman T.F. befinden.



**Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Komplementation der *clpB*- und *clpC*-Insertionsmutanten von *S. aureus* am Beispiel von *clpB*. A)** *S. aureus* N315 Genomregion von *clpB* (SA0835). **B)** Konstruktion von pEC1\_SA0835' durch Klonierung des *clpB*'-Fragments in pEC1. **C)** Integration des nicht in *S. aureus* replikativen Plasmids pEC1\_SA0835' in das Genom von *S. aureus* RN4220 per single cross-over.

### 3.13 Langzeitwachstum und Bestimmung der Lebendkeimzahl

Die über Nachtkulturen wurden wie unter Kap. 3.1.1 beschrieben angesetzt und inkubiert. Die Bestimmung des Langzeitwachstums verschiedener *clp*-Mutanten von *S. aureus* erfolgte in 50 ml BHI bei 37°C und 230 rpm über einen Zeitraum von 7 Tagen. In den ersten 8 Std. wurden alle 2 Std. und darauffolgend alle 24 Std. Proben zur Bestimmung des Wachstums durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm einer 1:10 Verdünnung und zur Bestimmung der Lebendkeimzahl entnommen. Die Lebendkeimzahlbestimmung erfolgte dabei durch Ausplattieren entsprechender Verdünnungen auf MHI- (Müller-Hinton) Agar, Inkubation bei 37°C, üN und anschließender Bestimmung der Kolonienanzahl als KBE/ml.

## 3.14 Aconitase (CitB)-Aktivitätsbestimmung

### 3.14.1 Aconitase-Assay

Die Aconitase (CitB)-Aktivitätsbestimmung wurde mit geringen Abweichungen nach der Methode von Kennedy *et al.* [1983] durchgeführt.

Zur Bestimmung der CitB-Aktivität von *S. aureus clp*-Mutanten wurden die Zellen wie unter 3.13 beschrieben angezogen. Es folgte eine Entnahme von 2 ml Bakteriensuspension nach 24, 48, 72 und 96 Stunden Wachstum. Die Bakterien wurden bei 8000 g für 10 min bei 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 850 µl ACN-Puffer (Tab. 3.7) resuspendiert. Die Suspension wurde in eine Lysing Matrix B überführt und die Zellen im Ribolyser bei der Geschwindigkeitsstufe 6,0 für 30 sec aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation bei 22000 g für 1 min und 4°C wurden 300 µl vom Überstand direkt bei -20°C für eine spätere Proteinbestimmung gelagert und weitere 500 µl des Überstandes für die CitB-Aktivitätsbestimmung verwendet.

Die Messung der CitB-Aktivität erfolgte jeweils mit 50 µl und 100 µl des Bakterienlysates. Die Zusammensetzung der Mastermixe zur CitB-Aktivitätsbestimmung können Tabelle 3.6 entnommen werden. Zur Messung wurde das Bakterienlysate mit dem Mastermix in einer UV-Küvette gemischt und direkt für eine Dauer von 10 min jede Minute die optische Dichte bei 240 nm notiert.

Die Veränderung der OD<sub>240</sub> über die Zeit gibt dabei einen Aufschluss über die CitB-Aktivität im Zelllysate, wobei die spezifische CitB-Aktivität als Units/mg an Gesamt-Protein im Zelllysate bestimmt wird. Eine Unit wird als die Menge an Enzym definiert, die in einer Veränderung von 0,0033 A<sub>240</sub>-Einheiten pro Minute resultiert.

**Tab. 3.6: Zusammensetzung der Mastermixe zur Aconitase-Aktivitätsbestimmung**

Komponente	Menge [µl]
1 M Tris (pH 8,0)	90
100 mM Isocitrat	200
HPLC-H <sub>2</sub> O	660
Zelllysate	50
1 M Tris (pH 8,0)	90
100 mM Isocitrat	200

HPLC-H <sub>2</sub> O	610
Zelllysate	100

**Tab. 3.7: Zusammensetzung des ACN-Puffer**

Komponente	Konzentration
Tris (pH 8,0)	90 mM
Fluorocitrat	0,1 mM

### 3.14.2 Modifiziertes Lowry Protein Assay

Die Erstellung der Standardkurve sowie die Proteinbestimmung wurde mit dem Modified Lowry Protein Assay Kit von Thermo Scientific, Karlsruhe, nach Angaben des Herstellers durchgeführt und beruht auf der Methode nach Lowry *et al.* [1951].

Für die Bestimmung des Gesamt-Proteins im Zelllysate (3.14.1) wurden je Probe die Verdünnungen 1:10, 1:20 und 1:40 gewählt.

## 3.15 Untersuchung der Biofilmbildung

### 3.15.1 Biofilmbildung in 24-well Schalen

Die Untersuchung der Biofilmbildung der *S. aureus clp*-Mutanten erfolgte in 24-well Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) nach 24 Std. Inkubation bei 37°C in 1 ml TSB-Medium mit 1% Glucose. Es wurde mit den *S. aureus* Zellen ein McFarland (McF) von 0,5 in TSB mit Zusätzen eingesetzt. Dieser wurde unter Verwendung des Vitek Densicheck (Biomérieux, Marcy, Frankreich) eingestellt. Ein McF von 0,5 entspricht dabei einer Zellzahl von ca.  $10^8$  Bakterienzellen/ml. Mit 1:2 bis 1:64 Verdünnungen des McF 0,5 wurden Wells einer 24-well-Platte inokuliert und 24 Std. bei 37° inkubiert. Danach erfolgte ein vorsichtiges Abnehmen des Mediums ohne dabei den an dem Boden der 24-well-Platte adhärierenden Biofilm zu beschädigen. Nach 3-maligem Waschen mit 1xPBS wurde sämtliche Flüssigkeit abgezogen und der Biofilm im Well bei 37°C getrocknet. Die Färbung erfolgte, indem 800 µl 0,1% Safranin ca. 30 sec auf den Biofilm einwirkten. Anschließend wurde 3-mal vorsichtig mit H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub> gewaschen und das Ergebnis fotografisch dokumentiert. Die Zugabe von 30% Essigsäure resultierte in einem Herauswaschen des Safranins aus dem Biofilm. Es folgte die Messung der Absorption bei 530 nm, wobei eine 1:10 Verdünnung eingesetzt wurde.



### 3.15.2 Biofilmbildung in 96-well Schalen

Die Methode der Biofilmbildung in 96-well Schalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) beruht auf der Methode nach Frees *et al.* [2004].

Die *S. aureus* Kulturen wurden hierfür ausgehend von einer üNK zu einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,02 in TSB inokuliert und bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Bei Erreichen der exponentiellen Phase bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 erfolgte eine 10<sup>-1</sup>- bis 10<sup>-3</sup>-Verdünnung der Kultur in TSB mit 2,5% Glucose und Inokulation von 200 µl TSB mit 2,5% Glucose mit 5 µl der Verdünnung pro well. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurde der entstandene Biofilm mit einem adäquaten Volumen an 1xPBS, 0,1% Safranin und H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub>, wie unter 3.15.1 beschrieben, gewaschen, gefärbt, erneut gewaschen, per Foto dokumentiert und die OD<sub>530</sub> bestimmt.

### 3.16 Internalisierung-Assay und Assay zur intrazellulären Persistenz

#### Vorbereitung der Bakterienzellen

Die Vorbereitung der Bakterienzellen für den Internalisierung- und Persistenz-Assay erfolgte indem eine Kultur in BHI wie unter Kap. 3.1.1 beschrieben inokuliert und für 16 Std bei 37°C und 230 rpm inkubiert wurde. Danach wurde die Kultur bei 5100 rpm für 10 min in einem 50 ml Greinertube pelletiert und mit 1 Vol 1xPBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (wie zuvor beschrieben) wurden die gewaschenen Bakterien in 1 ml Aliquots bei -20°C weggefroren und anschließend eine Bestimmung der Lebendkeimzahl als KBE/ml durchgeführt.

#### Präparation der eukaryoten Zellen

Die Präparation der EA.hy926- und HaCaT-Zellen erfolgte ein Tag vor dem eigentlichen Internalisierung- und Persistenz-Assay. Hierzu wurden die eukaryoten Zellen (wie unter 3.1.2 näher beschrieben) trypsinisiert, in ein 50 ml Greinertube überführt und die Zellzahl bestimmt. Währenddessen wurden die eukaryoten Zellen in dem Greinertube für 5 min bei 1400 rpm pelletiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und mit den Zellen im Pellet eine Zellzahl von 7,5\*10<sup>5</sup> Zellen/ml in Vollmedium (Kap. 3.1.2) eingestellt. Daraus wurden je 400 µl pro well in einer 24-well Platte ausgesät und für ca. 24 Std. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, sodass die Zellen am darauf folgenden Tag konfluent waren. Es wurden je 2 wells einer 24-well Schale pro verwendetem *S. aureus* Stamm oder *clp*-Mutante und Zeitpunkt ausgesät.

### Internalisierung-Assay und Assay zur intrazellulären Persistenz

Für den Internalisierungs- und Persistenz-Assay wurde zunächst das Medium in der 24 well-Platte abgesaugt ohne dabei die adhärenenden eukaryoten Zellen zu schädigen. Dann wurde mit 500 µl 1xPBS gewaschen und im Anschluss 300 µl DMEM für EA.hy926- bzw. MCDB153 mit 1% AS für HaCaT-Zellen zugegeben. 2 der wells mit ausgesäten eukaryoten Zellen wurden für eine Zellzahl-Bestimmung verwendet, indem je 350 µl 1:10 T/E zugegeben und für ca. 15 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Nach den 15 min wurde zu den 350 µl T/E 650 µl DMEM oder MCDB153 mit 1% AS gegeben und mittels 0,5% Trypanblau die Zellzahl bestimmt (Kap. 3.1.2). Die aufgetauten Bakterien wurden vor Zugabe zu den eukaryoten Zellen für 10 sec per Ultraschall (50 Watt) gelöst. Anschließend wurde umgehend eine entsprechende Mol an Bakterien zu den eukaryoten Zellen pipettiert und die well-Platte bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert, um die Bakterienzellen auf die eukaryoten Zellen abzusinken und somit die Internalisierung zu fördern. Mol bedeutet Multiplicity of Infection und ist die Anzahl der Bakterien pro eukaryoter Zelle. Die Internalisierung der Bakterienzellen in die eukaryoten Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 90 min. In der Zwischenzeit wurde eine Bestimmung der KBE/ml der eingesetzten Bakterien durchgeführt, um eine tatsächlich korrekt eingesetzte Mol aufzeigen zu können. Die Internalisierung wurde durch einen Lysostaphinverdau gestoppt, indem das vorhandene Medium in den wells durch 200 µl DMEM oder MCDB153 + 1% AS mit 20 µg/ml Lysostaphin und 100 µg/ml Gentamicin ersetzt wurde. Nach 1 Std. Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden zunächst 100 µl aus jedem well auf Schafsbloodagar überführt und bei 37°C üN inkubiert, um die Effizienz des Lysostaphinverdaus zu überprüfen. Danach erfolgte die Lyse der eukaryoten Wirtszellen. Für die Determination der intrazellulären Persistenz der verwendeten *S. aureus* Zellen wurde das in den wells befindliche Medium nach der Internalisierung mit 300 bis 400 µl DMEM oder MCDB153 + 1% AS mit 20 µg/ml Lysostaphin, 100 µg/ml Gentamicin und 2% FBS ersetzt und für die gewählten Zeiten von 24, 96 und 168 Std. inkubiert, wobei stets nach 5 Tagen das vorhandene Medium gegen 300 µl DMEM oder MCDB153 + 1% AS mit 100 µg/ml Gentamicin und 10% FBS gewechselt wurde. Anschließend erfolgten erneut die Überprüfung der bakteriellen Last im Überstand des Mediums, bevor mit der Lyse der eukaryoten Zellen begonnen wurde. Vor jeder Lyse wurden die eukaryoten Zellen mikroskopisch überprüft. Zur Lyse wurde das Medium in den wells abgesaugt, mit 500 µl 1xPBS gewaschen, das 1xPBS abgesaugt und 200 µl 1:10 T/E zugefügt. Nach 1 Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde zu den

200 µl 1:10 T/E 750 µl kaltes H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub> zugefügt, die eukaryoten Zellen in ein ERG überführt, gut gemischt und bei 5000 g und 4°C für 5 min pelletiert. Anschließend wurde etwa ¾ des Überstandes abgenommen und 900 µl kaltes H<sub>2</sub>O<sub>mill</sub> zugefügt, gut gemischt, für 10 min bei 4°C inkubiert, erneut gemischt und bei 9000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach erneutem Durchmischen wurde der Ansatz für 15 sec per Ultraschall (50 Watt) behandelt. Danach wurden zügig 100 µl einer 9% NaCl-Lösung zugegeben und entsprechende Verdünnungen auf MHI-Agar ausplattiert. Nach Inkubation üN bei 37°C konnten die entstandenen Bakterienkolonien ausgezählt und damit die KBE/ml ermittelt werden.

Die Bestimmung der internalisierten Bakterien nach 90 min Co-Inkubation mit eukaryoten Zellen erfolgte als KBE/well. Die intrazelluläre Persistenz wurde nach 24, 96 und 168 Std. als prozentualer Anteil der internalisierten Bakterien bestimmt. Dabei entsprachen die internalisierten Bakterien 100%.

### 3.17 Test auf α-Hämolysin Aktivität

Für den Test der *S. aureus clp*-Mutanten auf α-Hämolysen wurde ein McFarland von 0,5 in LB-Medium durch Verwendung eines Vitek Densicheck (Biomérieux, Marcy, Frankreich) eingestellt. Von dem McF von 0,5 wurden anschließend 2,5 µl auf eine TSA-Platte mit 5% Kaninchenblut gespottet. Nach Trocknen wurde die Agarplatte für 24 Std. bei 37°C inkubiert. Das Auftreten eines Lysehofs auf der Platte mit Kaninchenblut nach dieser Inkubation war ein Indiz für eine vorhandene α-Hämolysen. Die Ergebnisse wurden per Fotodokumentation festgehalten.

### 3.18 Apoptose- und Nekrose-Assay

Der Assay zur Detektion der Apoptose und Nekrose wurde mit den beiden eukaryoten Zelllinien HaCaT und EA.hy926 nach 24 Std. intrazellulärer Persistenz verschiedener *S. aureus clp*-Mutanten in Abwesenheit von Lysostaphin und Gentamicin durchgeführt. Vor der Färbung zur Detektion der Apoptose und Nekrose wurden die eukaryoten Zellen mikroskopisch überprüft, eine Bilddokumentation durchgeführt und zudem 100 µl aus jedem well auf Schafsblutagar überführt und bei 37°C inkubiert, um evtl. aus den eukaryoten Zellen ausgetretene Bakterien nachweisen zu können.

Die Internalisierung erfolgte wie in Kapitel 3.16 beschrieben. Es wurden zusätzlich zu je 2 wells pro verwendetem *S. aureus* Isolat oder *clp*-Mutante, je ein weiteres well für die positiv

und negativ Kontrollen ausgesät. Dabei handelt es sich um eukaryote Zellen, die ohne die Anwesenheit von Bakterien inkubiert wurden.

Für die Apoptose- und Nekrosefärbung wurde in einem ersten Schritt zu der positiv Kontrolle 10 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegeben und ca. 20 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis eine Abkugelung der eukaryoten Zellen mikroskopisch zu erkennen war.

Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die eukaryoten Zellen mit 500 µl 1xPBS gewaschen, das 1xPBS abgesaugt und 200 µl 1:10 T/E für 15 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> zugegeben. Währenddessen wurde in die FACS-Tubes (Sarstedt, Nürnberg) 1,5 ml 1xAnnexin-Bindepuffer (1xABB) gefüllt und nach der Inkubation die trypsinisierten Zellen mit 500 µl 1xABB in die Tubes überführt. Es folgte die Zentrifugation bei 1400 rpm für 5 min bei RT und Vorbereitung der Färbelösung, die sich aus 100 µl 1xABB und 3 µl Annexin V-APC (BD, Heidelberg) zusammensetzte. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und 100 µl der Färbelösung zur Detektion der frühen Apoptose zugegeben. Nach Inkubation für 20 min im Dunkeln bei RT wurde 1 µl Propidiumiodid (1 mg/ml; Fluka, Buchs, Schweiz) zur Detektion der späten Apoptose bzw. Nekrose zupipettiert und weitere 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1400 rpm und RT, der Überstand wurde danach verworfen und das Zellpellet mit 1,5 ml 1xABB gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 1400 rpm für 5 min bei RT wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl 1xABB resuspendiert. Danach sollte die Messung der Apoptose und Nekrose unter Verwendung des FACSCalibur von BD, Heidelberg innerhalb einer Stunde erfolgen.

Tabelle 3.8 kann die Zusammensetzung des 10xAnnexin-Bindepuffers entnommen werden.

**Tab. 3.8: Zusammensetzung des 10x Annexin-Bindepuffers**

Komponente	Konzentration
Hepes	10 mM
NaCl	140 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM
	pH 7,4, autoklavieren

### 3.19 Maus-Abszess-Modell

Die Untersuchung des Einfluss der *clpC*-Mutation auf die Infektiosität von *S. aureus* erfolgte mit dem Isolat Newman T.F. unter Verwendung eines Maus-Abszess-Modells [Hill *et al.*, 1974]. Bei diesem bekamen 8 Wochen alte weibliche C57Bl/6N Mäuse unter Narkose retro-orbital  $1 \cdot 10^7$  KBE in 100  $\mu$ l einer Bakteriensuspension injiziert. Es wurden in jedem Experiment je 8 Mäuse pro Isolat verwendet. Die Bakterien wurden wie unter Kapitel 3.1.1 in BHI bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 inkubiert. Es folgte die Pelletierung von 400  $\mu$ l Bakterienkultur bei 14000 rpm für 1 min, Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Pellets in 1 ml 1xPBS. Nach erneutem Pelletieren bei 14000 rpm für 1 min und der Aufnahme des Pellets in 1 ml 1xPBS wurden die Mäuse mit der gewaschenen Bakteriensuspension inokuliert. Zudem wurden entsprechende Verdünnungen der mit 1xPBS gewaschenen Bakterien auf Schafsblutagar ausplattiert, bei 37°C, üN inkubiert und die KBE/ml bestimmt. Somit konnte eine tatsächlich eingesetzte KBE/ml von  $1 \cdot 10^8$  aufgezeigt werden. Die Tiere bekamen nach erfolgter Inokulation der Bakterien täglich subcutan 100  $\mu$ l Carprofen injiziert und wurden einer Gewichtskontrolle unterzogen.

4 Tage nach der retro-orbitalen Injektion erfolgte die Euthanasie der Versuchstiere und Entnahme der Organe. Leber, Niere, Milz und Lunge wurden mittels Histologie untersucht. Ca. 200 mg der Leber wurden außerdem unter Verwendung eines 2 ml Glasmörser der Firma Wheaton, USA in einem Endvolumen von 1 ml TSB homogenisiert und in den Verdünnungen  $10^{-2}$  bis  $10^{-6}$  auf Schafsblutagar überführt und üN bei 37°C inkubiert. Durch das Auszählen der entstandenen Kolonien und die Bestimmung der KBE/mg Leber konnte auf die bakterielle Last in dem entsprechenden Gewebe *in vivo* rückgeschlossen werden.

## 4 Ergebnisse

Durch Langzeitwachstums-Experimente mit *S. aureus* DSM20231 Kulturen über 7 Tage konnte eine wichtige Funktion der HSP100/Clp ATPase ClpC in der Aufrechterhaltung der Aconitase (CitB), einem Schlüsselenzym des Zitratzyklus, in späten Wachstumsphasen aufgezeigt werden. Während Bakterienzellen des Wildtyp-Stammes DSM20231 in Schüttelkultur einen post-stationären „regrowth“ (eine erneute Replikation) nach 72 Stunden Kultivierung mit anschließendem unwiderruflichem Eintritt in die Sterbephase aufzeigten, wiesen *S. aureus* Zellen einer isogenen *clpC*-Mutante, PBM001, im Gegensatz dazu diesen zweiten Wachstumsschub nicht auf, zeigten dafür aber eine deutlich höhere Überlebensrate nach 96 und 168 Std. [Chatterjee *et al.*, 2005; Kap. 4.1.3].

Da in Vorarbeiten eine signifikante Erhöhung der ClpB Expression in einer *clpC*-Mutante [Chatterjee *et al.*, 2009b; Frees *et al.*, 2004] beobachtet wurde, war es eines der Ziele dieser Arbeit, eine DSM20231 *clpB*-Mutante zu generieren und damit die Funktion von ClpB im *in vitro* Langzeitüberleben von *S. aureus* zu untersuchen.

Die Erstellung der DSM20231 *clpB*-Insertionsmutante ist in Kapitel 3.12.2 ausführlich beschrieben.

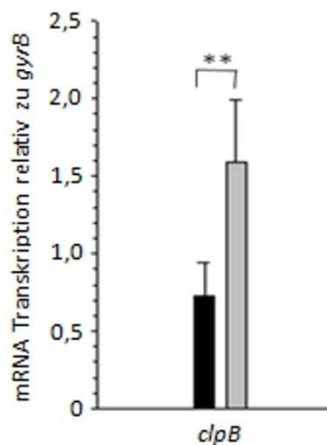
Im Folgenden werden Insertionsmutanten, wie z.B. DSM20231 *clpB*, stets mit dem inserierten Gen unmittelbar hinter dem *S. aureus* Isolat in dem sich die Mutation befindet benannt. Bei Deletionsmutanten wird dem mutierten Gen ein Delta ( $\Delta$ ) vorangestellt, wie beispielsweise bei DSM20231  $\Delta mazEF$ .

### 4.1 Verifizierung des Einflusses von ClpB auf das *in vitro* Langzeitüberleben von *S. aureus* DSM20231

#### 4.1.1 Untersuchung der Transkription von *clpB* in *S. aureus* DSM20231 nach *clpC* Inaktivierung

Frees *et al.* [2004] konnten unter Verwendung des *S. aureus* Stammes 8325-4 eine Erhöhung von ClpB in Zellen ohne funktionellem *clpC* aufzeigen. Aus diesem Anlass wurde in einem ersten Experiment die Transkription von *clpB* in PBM001 (DSM20231 *clpC*) mit der des Wildtyps (WT) DSM20231 verglichen. Hierfür wurde nach 7 Std. in Kultur aus den

verwendeten Stämmen RNA isoliert und die Transkription von *clpB* mittels des RT-Primerpaars *clpB* + und *clpB* - (Tab. 2.6) gemessen. In Abb. 4.1 sind die resultierenden *clpB* Transkriptmengen relativ zur Transkription des „housekeeping“ Genes *gyrB* dargestellt.



**Abb. 4.1: Bestimmung der *clpB* Transkription in DSM20231 *clpC*.** Es wurde nach 7 Std. Wachstum in BHI aus Kulturen von DSM20231 (■) und der Mutante PBM001 (DSM20231 *clpC*; ▒) Proben für die RNA-Isolierung entnommen. Die *clpB* mRNA Transkription wurde anschließend mittels Real-Time PCR relativ zur Expression des „housekeeping“ Gens *gyrB* quantifiziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. \*\*  $P < 0.01$  im Vergleich zum WT (Wilcoxon Rangsummentest).

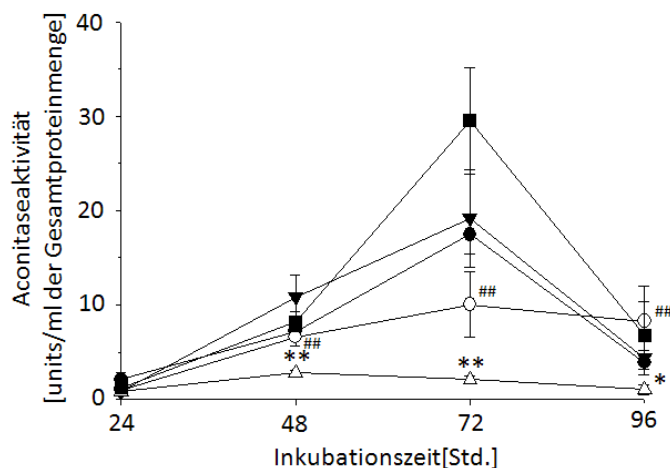
Es konnte in Einklang mit der Literatur eine signifikante Steigerung der *clpB* Transkription in der *S. aureus clpC*-Mutante PBM001 im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

#### 4.1.2 Bestimmung der Aconitaseaktivität in *S. aureus* DSM20231 *clpB* und DSM20231 *clpC*

Über einen aktiven Zitratzyklus kann das während der Glykolyse unter aeroben Bedingungen produzierte und in das umgebende Medium abgegebene Acetat nach Wiederaufnahme durch die Bakterienzelle als sekundäre Kohlenstoffquelle katabolisiert und zur Energiegewinnung verwendet werden. Die Nutzung dieses Energiegewinnungsweges resultiert neben dem „regrowth“ der Bakterienzellen aber auch im energieabhängigen Eintritt in die Sterbephase [Chatterjee, 2005].

PBM001 (DSM20231 *clpC*) Zellen haben im Gegensatz zum Wildtyp eine deutlich verringerte CitB- sowie Zitratzyklusaktivität und sind dementsprechend zur Metabolisierung von Acetat zur sekundären Erzeugung von Energie so gut wie nicht in der Lage, weisen dabei aber ein verbessertes Langzeitüberleben auf [Chatterjee *et al.*, 2005].

Im Folgenden sollte die CitB-Aktivität von DSM20231 *clpB* untersucht werden. Hierfür wurden *S. aureus* Zellen von DSM20231, DSM20231 *clpB* und zur Kontrolle die bereits von Chatterjee *et al.* [2005] untersuchte DSM20231 *clpC*-Mutante PBM001 sowie die beiden *clpB*- und *clpC*-Komplementanten DSM20231 *clpB/clpB<sup>+</sup>* und DSM20231 *clpC/clpC<sup>+</sup>* wie unter „Methoden“ beschrieben nach 24, 48, 72 und 96 Std. geerntet und für die CitB-Aktivitätsbestimmung verwendet (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Bestimmung der Aconitaseaktivität.** Es wurden nach 24, 48, 72 und 96 Std. Wachstum der *S. aureus* Kulturen in BHI bei 37°C und 230 rpm Proben für die Aconitaseaktivitäts-Bestimmung entnommen. Die Aconitaseaktivität von DSM20231 (◆), *clpB* (○), PBM001 (DSM20231 *clpC*; △) sowie den Komplementanten *clpB/clpB<sup>+</sup>* (▼) und *clpC/clpC<sup>+</sup>* (■) wurde als units/ml der Gesamtproteinmenge analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  zwischen *clpC* und WT, *clpB/clpB<sup>+</sup>* und *clpC/clpC<sup>+</sup>*; ##  $P < 0.01$  zwischen *clpB* und PBM001 (Wilcoxon Rangsummentest).

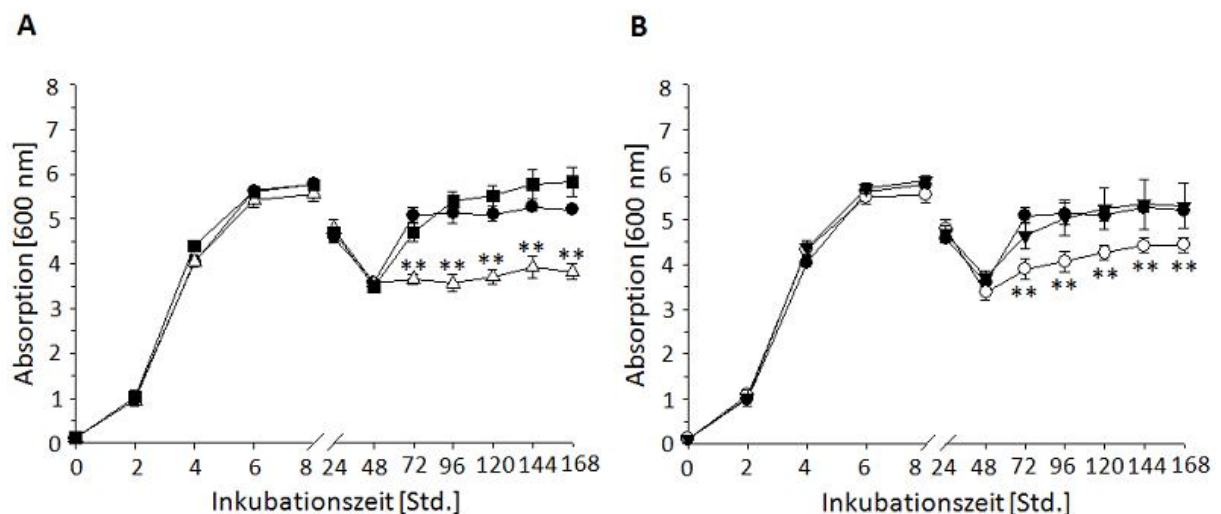
Die CitB-Aktivität der *clpC*-Mutante war den Erwartungen entsprechend [Chatterjee *et al.*, 2005] im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert und betrug über den gesamten Messzeitraum nahezu Null (Abb. 4.2), während beim Wildtyp nur zu Beginn der Messung, bei 24 Std., nahezu keine Aktivität zu verzeichnen war, diese aber nach 48 Std. auf ca. 7 units/ml der Gesamtproteinmenge anstieg. Im Zeitraum von 48 Std. auf 72 Std. zeigte sich dann ein weiterer deutlicher Anstieg um 10 units/ml der Gesamtproteinmenge, wobei in den darauf folgenden 24 Std. (72 bis 96 Std.) die CitB-Aktivität wieder auf fast Null herabfiel. Die CitB-Aktivität der *clpB*-Mutante stieg ebenfalls in dem Zeitraum von 24 Std. zu 72 Std. an, im Vergleich zum Wildtyp war dieser Anstieg jedoch deutlich schwächer. Zudem blieb diese in den folgenden 24 Std. nahezu konstant bei ca. 10 units/ml der Gesamtproteinmenge. Die



CitB-Enzymaktivität der Komplementante *clpC/clpC<sup>+</sup>* war zwar tendenziell höher als die des Wildtyp, wies aber, ebenso wie *clpB/clpB<sup>+</sup>*, keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf und zeigte den gleichen Wachstumsphasen-abhängigen Verlauf (Kap. 4.1.3).

#### 4.1.3 Bestimmung des Langzeitwachstum und der Lebendkeimzahl von *S. aureus* DSM20231 *clpB* sowie DSM20231 *clpC*

Das *in vitro* Langzeitüberleben wurde unter Verwendung von BHI (Brain Heart Infusion) und aeroben Schüttelbedingungen (230 rpm) über einen Zeitraum von 7 Tagen bestimmt. Die durch die Messung der Absorption bei 600 nm zu den angegebenen Zeitpunkten resultierenden Wachstumskurven des Wildtyps DSM20231, der *clpC*-Mutante (PBM001), von der bereits ein deutlich verbessertes Überleben in der stationären Phase bekannt ist [Chatterjee *et al.*, 2005] sowie der Komplementante *clpC/clpC<sup>+</sup>* sind in Abb. 4.3 A dargestellt. Im Vergleich dazu können die Wachstumseigenschaften von DSM20231, der *clpB*-Mutante und der Komplementante *clpB/clpB<sup>+</sup>* dem Graph in Abb. 4.3 B entnommen werden.

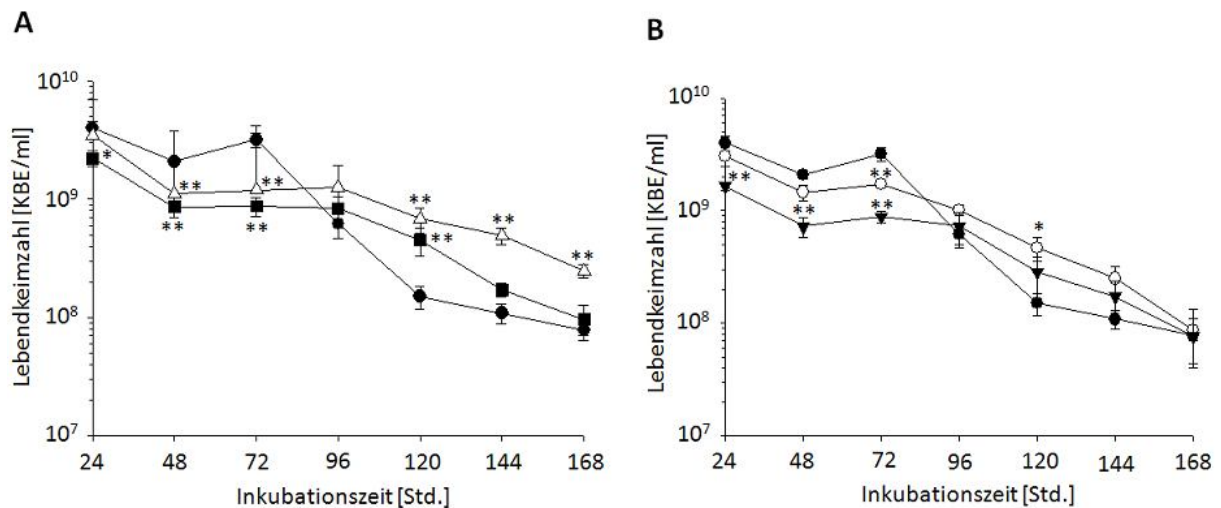


**Abb. 4.3: Langzeitwachstum der DSM20231 *clpB* und *clpC* Derivate.** Bestimmung des Langzeitwachstums über einen Zeitraum von 7 Tagen in BHI bei 37°C und 230 rpm. Das Wachstum wurde durch Probenentnahme zu den angegebenen Zeitpunkten und Messung der Absorption bei 600 nm bestimmt. **A)** DSM20231 (—◆—), PBM001 (DSM20231 *clpC*; —△—) und *clpC/clpC<sup>+</sup>* (—■—). **B)** DSM20231 (—◆—), *clpB* (—○—) und *clpB/clpB<sup>+</sup>* (—▼—). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler von 6 unabhängigen Experimenten. \*\*  $P < 0.01$  im Vergleich zum WT und der Komplementante (Wilcoxon Rangsummentest).

Wie schon aus Vorarbeiten bekannt, ließ sich bei der Betrachtung der Wachstumskurven Abb. 4.3 A in den ersten 48 Std. kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *clpC*-

Mutante erkennen (Chatterjee *et al.*, 2005). Alle Isolate zeigten in den ersten 24 Std. vergleichbare lag- und exponentielle (von 0 bis ca. 4 Std.) sowie post-exponentielle (von ca. 4 Std. bis zum Messzeitpunkt von ca. 24 Std.) Phasen und von 24 auf 48 Std. ließ sich bei allen Stämmen eine Abnahme der Absorption bei 600 nm von ca. 5 auf 3,5 erkennen. In der post-stationären Phase hingegen zeigte sich von 48 auf 72 Std. ein deutlicher Anstieg der Zelldichte von DSM20231 und *clpC/clpC*<sup>+</sup> auf fast 5, die anschließend bis zum Ende der Messung bei 168 Std. konstant blieb. Bei der *clpC*-Mutante PBM001 war kein solcher Anstieg der Absorption bei 600 nm nach 72 Std. erkennbar. Die Absorption [600 nm] von ca. 3,5 nach der Abnahme der Zelldichte bei 24 Std. blieb bis zu 168 Std. nahezu konstant. PBM001 verblieb folglich deutlich länger in der stationären Phase und verhielt sich damit signifikant unterschiedlich zu Wildtyp und Komplementante. Zu erwähnen ist hierbei außerdem, dass die Zunahme der Zelldichte des Wildtyps und der *clpC*-Komplementante von 48 auf 72 Std. mit dem Anstieg der CitB-Aktivität (Abb. 4.2) korreliert. Die *clpC*-Mutante wies hingegen keine Zunahme der Zelldichte und eine kaum detektierbare CitB-Aktivität auf. Ähnlich wie zuvor für die *clpC* Derivate beschrieben zeigten auch die Wachstumskurven der *clpB* Derivate in den ersten 48 Std. keinen Unterschied zum Wildtyp (Abb. 4.3 B). In dem folgenden Inkubationszeitraum konnten zwischen der *clpB*-Mutante und dem Wildtyp zwar signifikante Unterschiede im „regrowth“ beobachtet werden, anders als bei der *clpC*-Mutante ist jedoch bei der *clpB*-Mutante, ähnlich zum Wildtyp, eine klare Zunahme der Zelldichte zu verzeichnen. Auffallend ist, dass die geringere Zunahme in der Zelldichte von 48 auf 72 Std. wieder mit dem im Vergleich zum Wildtyp geringeren Anstieg der CitB-Aktivität (Abb. 4.2) korrelierte.

Neben der Messung der Absorption bei 600 nm für das Langzeitwachstum wurde zudem die Lebendkeimzahl als KBE/ml bestimmt. Die resultierenden Graphen sind in Abb. 4.4 dargestellt.

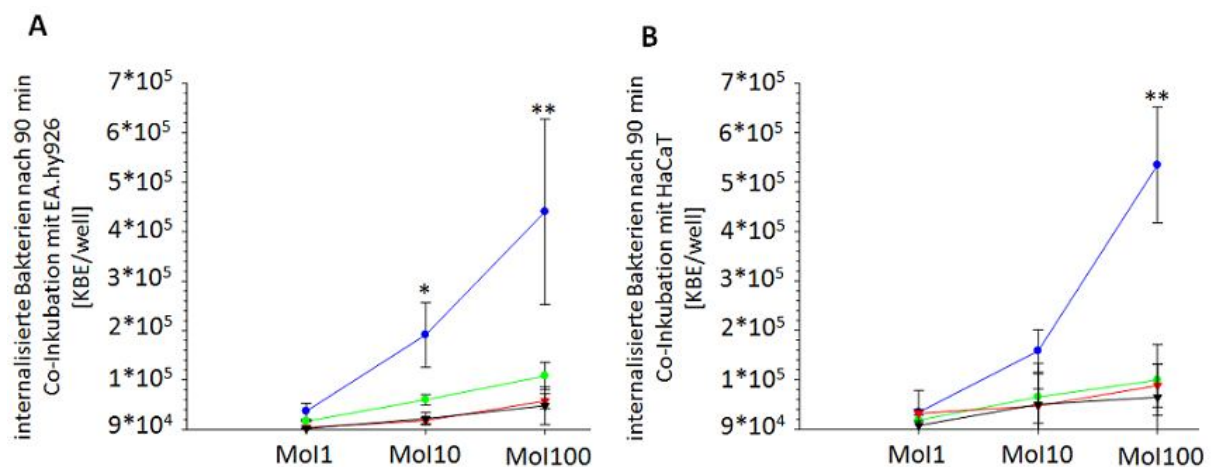


**Abb. 4.4: Bestimmung der Lebendkeimzahl der DSM20231 *clpB* und *clpC* Derivate.** Die *S. aureus* Kulturen wurden in BHI bei 37°C und 230 rpm inkubiert und aus diesen über einen Zeitraum von 24 bis 168 Std. Proben für die Bestimmung der Lebendkeimzahl als KBE/ml entnommen. **A)** DSM20231 (◆), PBM001 (DSM20231 *clpC*; ▲) und *clpC/clpC*<sup>+</sup> (■). **B)** DSM20231 (◆), *clpB* (○) und der Komplementante *clpB/clpB*<sup>+</sup> (▼). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler von 6 unabhängigen Experimenten. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01 im Vergleich zum WT (Wilcoxon Rangsummentest).

Homolog zur Abnahme der Zelldichte aller Stämme von 24 zu 48 Std. (Abb. 4.3) konnte ebenfalls eine Abnahme in der Lebendkeimzahl bei allen Stämmen um einen Faktor von ca. 2 (Abb. 4.4) detektiert werden. Auch die darauf folgende Zunahme der KBE/ml von DSM20231 von 48 auf 72 Std. um einen Faktor von 2 auf ca.  $4 \cdot 10^9$  KBE/ml (Abb. 4.4) stimmte mit der Zunahme der Zelldichte (Abb. 4.3) überein. Deutlich erkennbar war im Fall des Wildtyps im Anschluss an die Erhöhung nach 72 Std. Wachstum eine steile Reduktion der Lebendkeimzahl über die gemessene Zeit bis 168 Std. auf ca.  $8 \cdot 10^7$  KBE/ml. Bei der *clpC*-Mutante war keine Zunahme in der KBE/ml von 48 auf 72 erkennbar, stattdessen ließ sich ein deutlich verbessertes Überleben im Vergleich zum Wildtyp in den späten Wachstumsphasen ab 72 Std. erkennen (Abb. 4.4 A). Somit konnte die *clpC*-Mutante nach 168 Std. eine Lebendkeimzahl von ca.  $3 \cdot 10^8$  KBE/ml aufweisen. Die *clpB*-Mutante wies zwar, wie bereits bei der Wachstumsmessung (Abb. 4.3 B) beschrieben, auch bei der Bestimmung der Lebendkeimzahl eine Zunahme von 48 auf 72 Std. auf, diese war jedoch deutlich geringer als beim Wildtyp. In späten Wachstumsphasen, ab 72 Std., ähnelte die *clpB*-Mutante im Überleben aber dem Wildtyp. Beide Komplementanten wiesen in diesem Experiment in den ersten 72 Std. überraschenderweise ein im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlichen Anteil lebender Zellen auf, glichen jedoch in späten Wachstumsphasen dem Wildtyp.

## 4.2 Mol-Bestimmung für DSM20231, LS1, Newman T.F. und SH1000

Vor der Durchführung eines Internalisierungs- und Persistenz-Assay wurde stets eine Bestimmung des Einflusses der Multiplicity of Infection (Mol) auf diesen Assay für den jeweils verwendeten *S. aureus* Wildtyp durchgeführt, um eine eventuell vorhandene Zytotoxizität der Bakterien-Isolate gegenüber den eukaryoten Zellen auszuschließen. Dabei wurden die Mol's 1, 10 und 100 mit den eukaryoten Zelllinien EA.hy926 (Abb. 4.5 A) und HaCaT (Abb. 4.5 B) getestet.



**Abb. 4.5: Mol-Bestimmung.** Mol-Bestimmung für *S. aureus* DSM20231 (—●—), LS1 (—●—), Newman T.F. (—▼—) und SH1000 (—▼—) als KBE/well. Getestet wurden die Mol's 1, 10 und 100 nach 90 min Internalisierung in **A)** EA.hy926 **B)** HaCaT. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  im Vergleich zu LS1, Newman T.F. und SH1000 (t-Test).

Für die Isolate LS1, Newman T.F. und SH1000 zeigten sich dabei mit einer 10-fachen Zunahme der Mol von 1 auf 10 und 10 auf 100 für beide eukaryote Zelltypen jeweils nur vergleichsweise schwache Zunahmen in der Zahl internalisierter Bakterien. Einzig beim Isolat DSM20231 war hier ein klarerer Unterschied zu verzeichnen, da bei diesem Isolat mit zunehmender Mol eine stetig steigende Anzahl an aufgenommenen Bakterien [KBE/well] nach 90 min Co-Inkubation mit beiden eukaryoten Zelltypen nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.5), die im Gegensatz zu den anderen getesteten Isolaten bei den gewählten Mol's nicht zu einer Sättigung führte.

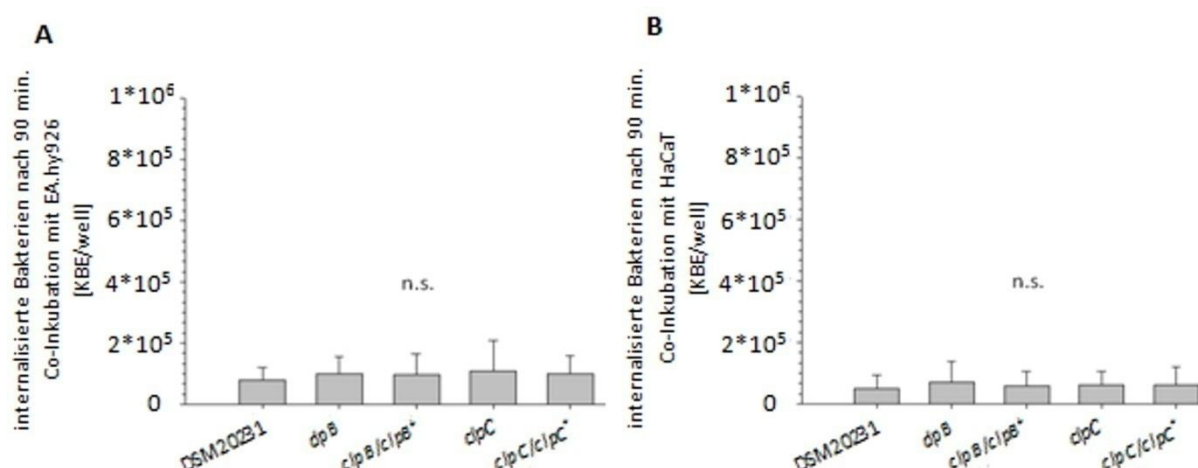
Durch eine zusätzlich zur Mol-Bestimmung durchgeführte mikroskopische Überprüfung der eukaryoten Zellen (Ergebnisse sind nicht dargestellt) konnte festgestellt werden, dass keiner der verwendeten *S. aureus* Stämme, DSM20231, LS1, Newman T.F. und SH1000 eine

markante Zytotoxizität gegenüber den eukaryoten Zellen innerhalb dieses experimentellen Setups aufwies. Für die folgenden Internalisierung- und Persistenz-Experimente wurde eine Mol von 100 eingesetzt.

### 4.3 Überprüfung der Internalisierung sowie des intrazellulären Langzeitüberleben von DSM20231 *clpB* und DSM20231 *clpC*

#### 4.3.1 Internalisierung-Assay mit DSM20231 *clpB* und DSM20231 *clpC*

In Abb. 4.6 sind die resultierenden Graphen für die Internalisierung von DSM20231, DSM20231 *clpB*, PBM001 (DSM20231 *clpC*) sowie den beiden Komplementanten für *clpB* und *clpC* dargestellt.



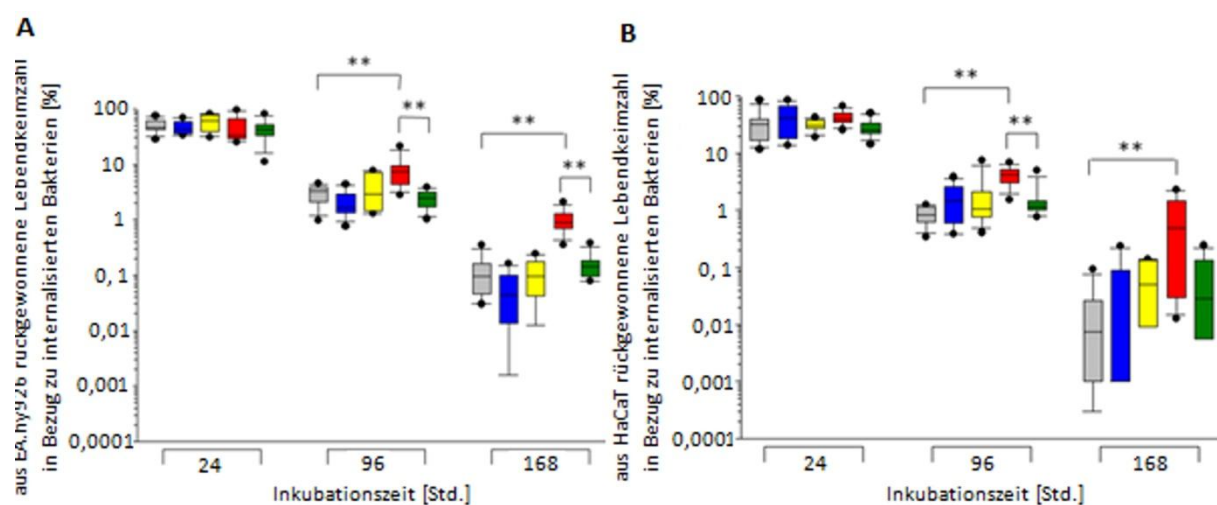
**Abb. 4.6: Internalisierung der DSM20231 *clpB* und *clpC* Derivate.** Internalisierung mit einer Mol von 100 von *S. aureus* DSM20231, den Mutanten *clpB* und *clpC* (PBM001) sowie den Komplementanten *clpB/clpB*<sup>+</sup> und *clpC/clpC*<sup>+</sup> in **A)** EA.hy926 **B)** HaCaT. Nach 90 min. Co-Inkubation mit den eukaryoten Zellen erfolgte ein Lysotaphinverdau zu diesem Zeitpunkt noch extrazellulärer Bakterien. Die aufgenommenen Bakterien wurden anschließend durch die Lyse der eukaryoten Zellen als KBE/well im eukaryoten Zelllysat ermittelt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 unabhängigen, jeweils in Duplikaten durchgeführten Experimenten. n.s. nicht signifikant (Wilcoxon Rangsummentest).

Die Untersuchung der Internalisierungsfähigkeiten des Wildtyps DSM20231, der *clpB*- und *clpC*-Mutanten sowie der beiden *clpB*- und *clpC*-Komplementanten in EA.hy926- und HaCaT-Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.6). Im Allgemeinen waren die

Internalisierungsraten in die endotheliale Zelllinie EA.hy926 mit ca.  $1 \cdot 10^5$  KBE/well etwas höher als die in die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT, die bei ca.  $5 \cdot 10^4$  KBE/well lag.

#### 4.3.2 Untersuchung der intrazellulären Persistenz von DSM20231 *clpB* und DSM20231 *clpC*

Die unter Verwendung der Stämme DSM20231, DSM20231 *clpB*, PBM001 (DSM20231 *clpC*) sowie der beiden Komplementanten für *clpB* und *clpC* erlangten Ergebnisse zur intrazellulären Persistenz in EA.hy926 und HaCaT können den Box- und Whiskerplots in Abbildung 4.7 entnommen werden.



**Abb. 4.7: Intrazelluläre Persistenz der DSM20231 *clpB* und *clpC* Derivate.** Nach der Internalisierung (Mol 100) wurden die eukaryoten Zelllinien **A)** EA.hy926 und **B)** HaCaT in Anwesenheit von Antibiotika für 24, 96 und 168 Std. inkubiert und die intrazellulär persistierenden Bakterienzellen im Anschluss mittels Lyse der eukaryoten Zellen rückgewonnen und die KBE/ml bestimmt. Dargestellt ist die intrazelluläre Persistenz von *S. aureus* DSM20231 (■), *clpB* (■), PBM001 (DSM20231 *clpC*; ■) sowie den Komplementanten *clpB/clpB*<sup>+</sup> (■) und *clpC/clpC*<sup>+</sup> (■) in Prozent [%] zur Gesamtmenge der nach 90 min Co-Inkubation intrazellulär lokalisierten Bakterien. Die Daten vierer unabhängigen, in Duplikaten durchgeführter, Experimente sind als Box- und Whiskerplot dargestellt. \*\*  $P < 0.01$  (Wilcoxon Rangsummentest).

Die Darstellung als Box- und Whiskerplot wurde gewählt, um aufzuzeigen in welchen Bereichen sich die Daten verteilen. Die Box zeigt auf, in welchem Bereich die mittleren 50% der Daten liegen. Durch die Länge der Box wird dabei die Streuung vermittelt. Der Median teilt als Lagemaß die Box in zwei Quartile und gibt den Häufigkeitsbereich an, in dem die Mehrheit der Daten liegt. Die Whisker geben die kleinsten und größten Werte an, die außerhalb der Box liegen und durch die Punkte werden extreme Ausreißer angezeigt.

Nach 24 Std. intrazellulärer Lokalisation konnten sowohl aus EA.hy926- (Abb. 4.7 A) als auch aus HaCaT-Zellen (Abb. 4.7 B) bei allen getesteten Derivaten vergleichbare Mengen an internalisierter Bakterien reisoliert werden, wobei aus EA.hy926-Zellen durchschnittlich 50% der nach 90 min Co-Kultur internalisierten Bakterienmengen aufgefunden werden konnten, bei HaCaT-Zellen ca. 30%. Nach 96 bzw. 168 Std. hingegen konnte aus den mit der *clpC*-Mutante infizierten EA.hy926- und HaCaT-Zellkulturen bis zu 10-mal mehr Bakterien reisoliert werden als aus den mit dem Wildtyp und der *clpC*-Komplementante behandelten Zellkulturen, die zueinander keinen klaren Unterschied aufwiesen. Ebenso waren für das Triplet DSM20231/*clpB*/Komplementante keine signifikanten Unterschiede in der intrazellulären Überlebensfähigkeit zu verzeichnen, auch wenn aus den mit der *clpB*-Mutante infizierten EA.hy926-Zellen nach 96 und 168 Std. Co-Kultur tendenziell weniger Bakterien reisoliert werden konnten als aus dem Wildtyp und der entsprechenden Komplementante.

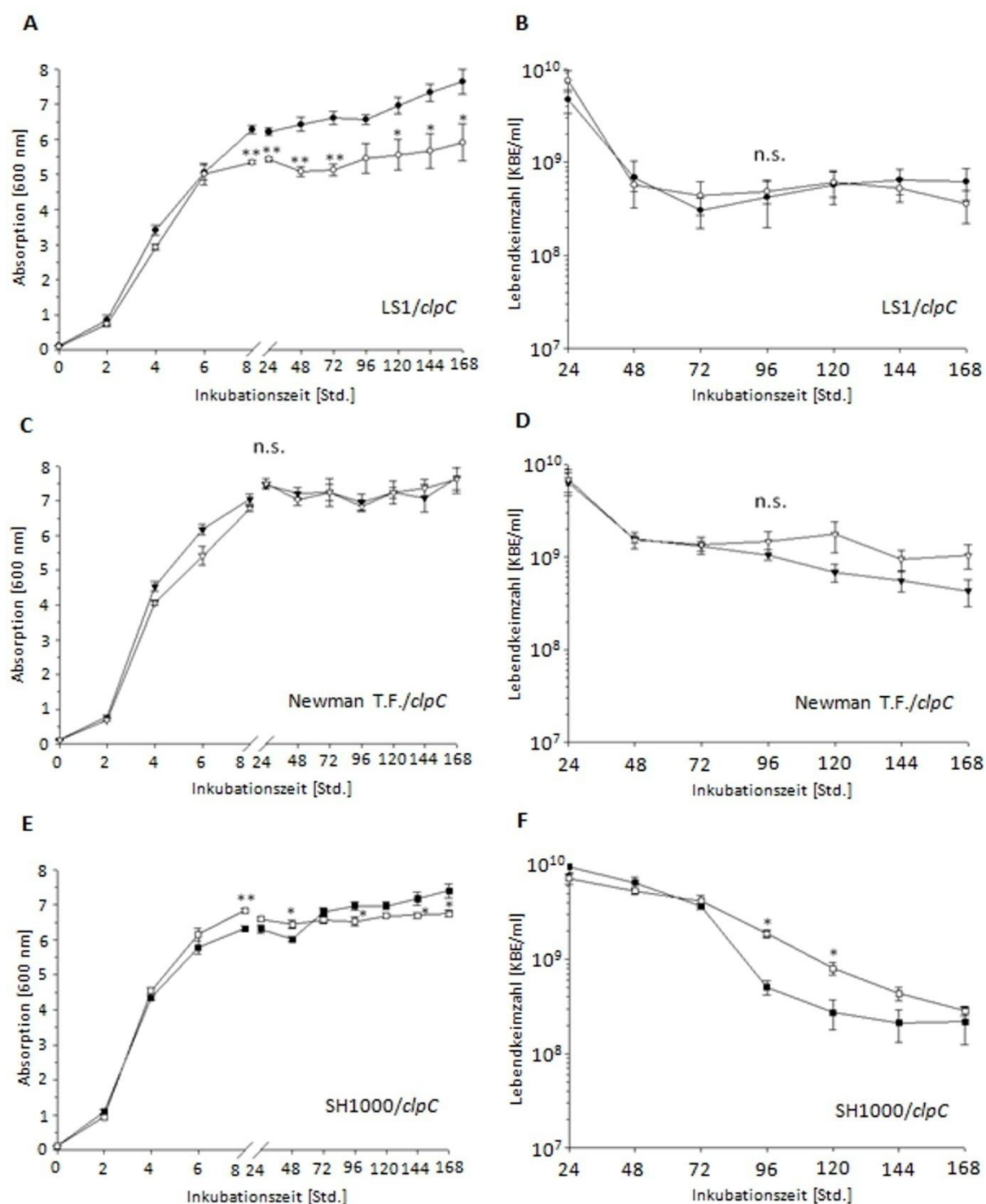
#### **4.4 Einfluss der *clpC* Inaktivierung auf das Langzeitüberleben *in vitro* und im Zellkulturmodell von weiteren *S. aureus* Stämmen**

Schon Chatterjee [2005] konnte ein erhöhtes Langzeitüberleben in der stationären Phase nach Inaktivierung von *clpC* in den beiden *S. aureus* Stämmen DSM20231 und SH1000 aufzeigen, einen „regrowth“ nach 72 Std. Wachstum unter Kulturbedingungen jedoch nur für das Isolat DSM20231 feststellen. Zudem wies PBM001 (DSM20231 *clpC*) im Vergleich zu SH1000 *clpC* ein besseres Langzeitüberleben über den gemessenen Zeitraum von 7 Tagen auf. In den folgenden Experimenten wurde daher der Einfluss einer *clpC* Inaktivierung auf das Langzeitüberleben *in vitro* und im Zellkulturmodell unter Verwendung weiterer, genetisch nicht dicht miteinander verwandter *S. aureus* Stämme wie LS1 und Newman T.F. untersucht.

##### **4.4.1 Bestimmung des Langzeitwachstum und der Lebendkeimzahl von *S. aureus* LS1 *clpC*, Newman T.F. *clpC* sowie SH1000 *clpC***

Die Bestimmung des *in vitro* Langzeitüberlebens der *S. aureus* Stämme LS1, Newman T.F. und SH1000 sowie der jeweiligen *clpC*-Mutanten erfolgte wie unter Kapitel 4.1.3 bereits für DSM20231 beschrieben. Die daraus entstandenen Wachstumskurven und die Lebendkeimzahlbestimmungen sind in Abbildung 4.8 dargestellt.





**Abb. 4.8: Bestimmung des *in vitro* Langzeitüberlebens von LS1, Newman T.F. und SH1000 sowie den *clpC*-Mutanten.** Bestimmung des Langzeitwachstums durch Messung der Absorption bei 600 nm über einen Zeitraum von 7 Tagen sowie Bestimmung der Lebendkeimzahl als KBE/ml über einen Zeitraum von 24 bis 168 Std. in BHI bei 37°C und 230 rpm. **A)** Wachstumskurven von LS1 (◆) und LS1 *clpC* (◇), **B)** Lebendkeimzahl von LS1 (◆) und LS1 *clpC* (◇), **C)** Wachstumskurven von Newman T. F. (▼) und Newman T. F. *clpC* (▽), **D)** Lebendkeimzahl von Newman T. F. (▼) und Newman T. F. *clpC* (▽), **E)** Wachstumskurven von SH1000 (■) und SH1000 *clpC* (□), **F)** Lebendkeimzahl von SH1000 (■) und SH1000 *clpC* (□). Die Daten repräsentieren



die Mittelwerte und Standardfehler von 6 unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  im Vergleich zum WT (Wilcoxon Rangsummentest).

Bei Betrachtung der Wachstumskurven von LS1 und LS1 *clpC* (Abb. 4.8 A) zeigt sich in den ersten 6 Std., der *lag* und exponentiellen Phase, ein nahezu identisches Wachstum. Ab dem Zeitpunkt 8 Std. hingegen wurde eine signifikant geringere Absorption bei 600 nm bei der *clpC*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp erkennbar, die über den gesamten restlichen Messzeitraum sichtbar blieb. Anders als bei DSM20231 (Kap. 4.1.3) war bei LS1 jedoch weder eine ausgeprägte Abnahme der OD<sub>600</sub> zwischen 8 und 48 Std. zu verzeichnen, noch war ein klarer „regrowth“ während der stationären/post-stationären Phasen (48 bis 72 Std.) zu beobachten. Auch bei der zur Wachstumsmessung zugehörigen Lebendkeimzahlbestimmung (Abb. 4.8 B) wurde zwischen LS1 und DSM20231 ein klarer Unterschied sichtbar. Hier zeigte sowohl LS1 als auch die entsprechende *clpC*-Mutante zwischen 24 und 48 Std. eine starke Abnahme an lebenden Zellen, die dann für den Rest des Beobachtungszeitraums auf einem vergleichbaren Niveau verblieb. Ebenso konnte bei diesem Assay kein klarer Unterschied in den KBE-Daten zwischen Wildtyp und *clpC*-Mutante beobachtet werden.

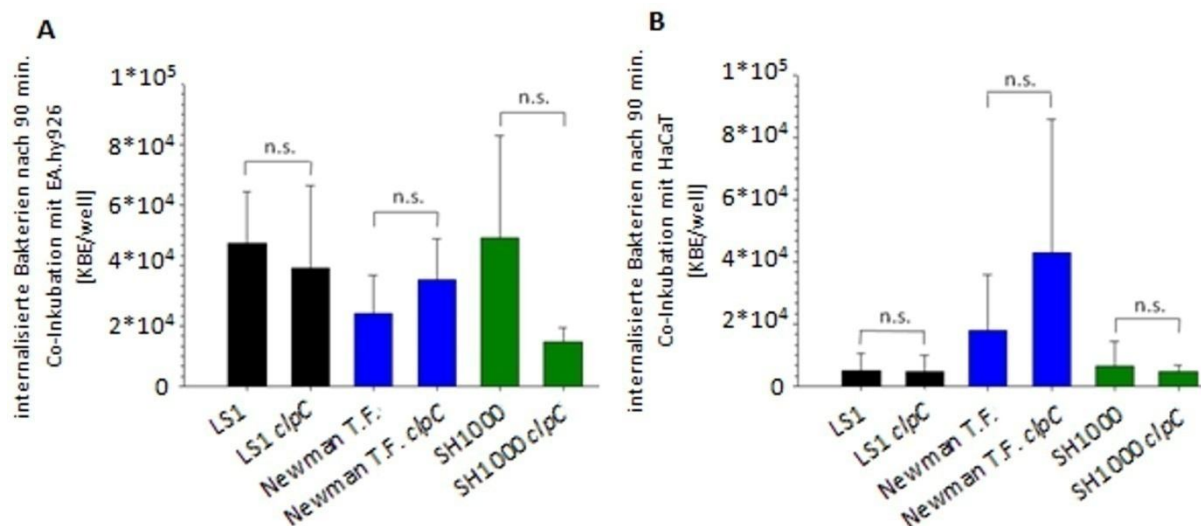
Auch bei dem Stammpaar Newman T.F./*clpC* zeigte sich im Langzeitwachstum klare Unterschiede zum Stammpaar DSM20231/PBM001. Ähnlich wie bei LS1 war auch bei Newman T.F. weder eine markante Abnahme der OD<sub>600</sub> zwischen 8 und 48 Std. zu beobachten, noch ein klarer „regrowth“ in der darauf folgenden Wachstumsperiode (48-72 Std.) zu erkennen. Anders als bei LS1 wiesen die Wachstumskurven von Newman T.F. und der entsprechenden *clpC*-Mutante jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum keinen klaren Unterschied auf (Abb. 4.8 C). Interessanterweise wiesen auch die Kulturen von Newman T.F. und der *clpC*-Mutante, ähnlich wie das LS1 Stammpaar, in dem Zeitraum 24 bis 48 Std. eine markante Abnahme der KBE/ml auf. Während die Anzahl vermehrungsfähiger Zellen in der Kultur des Wildtyp über die folgenden 144 Std. jedoch weiter abnahm, so zeigten die Kulturen der *clpC*-Mutante für den Zeitraum 48 bis 120 Std. annähernd gleichbleibende KBE/ml Werte, die auch nach dieser Periode weniger stark abnahmen als die der Wildtyp-Kulturen (Abb. 4.8 D).

In den Kulturen des Stammpaares SH1000/SH1000 *clpC* (Abb. 4.8 E, F) wurden in den ersten 6 Std. ebenfalls keine markanten Veränderungen im Wachstum sichtbar. Nach 8 Std. Wachstum hingegen zeigten die Kulturen der *clpC*-Mutante signifikant höhere Absorptionswerte, die bis zum Ende der Messung (168 Std.) nahezu konstant blieben und

durch einen schwachen „regrowth“ (48 auf 72 Std.) des Wildtyps von 96 Std. ab bis zum Ende der Messung nach 168 Std. unter denen des Wildtyps lagen. Hier ist zu erwähnen, dass die in dieser Arbeit beobachtete erneute Replikation von SH1000 nach 72 Std. Wachstum von Chatterjee [2005] nicht beobachtet wurde. Der „regrowth“ des Isolats SH1000 war dabei deutlich schwächer als die von DSM20231 beobachtete Zunahme der Absorption zu diesem Messzeitpunkt. Bei SH1000 war von 24 auf 72 Std. eine kontinuierliche, wenn auch im Vergleich zu LS1 und Newman T.F. geringere, Abnahme der KBE-Daten zu beobachten. Ein Anstieg der KBE-Werte des SH1000 Wildtyps nach 72 Std. Kultivierung, wie er für DSM20231 beobachtet wurde und mit der Zunahme der Absorption korreliert, wurde nicht festgestellt. Nach 96 Std. konnte bei SH1000, ähnlich wie bei DSM20231, eine markante Verringerung der KBE-Werte verzeichnet werden, die auf einen Eintritt in die Sterbephase zu diesem Zeitpunkt schließen lässt. Die KBE-Werte der *clpC*-Mutante hingegen fielen in dem Zeitraum 72 bis 186 Std. signifikant schwächer als die des Wildtyps, wenn auch stärker als die der DSM20231 *clpC*-Mutante.

#### 4.4.2 Internalisierung-Assay mit LS1, Newman T.F. und SH1000 sowie den jeweiligen *clpC*-Mutanten

Die Ergebnisse aus der Internalisierung mit LS1, Newman T.F. und SH1000 sowie den jeweils zugehörigen *clpC*-Mutanten in EA.hy926- und HaCaT-Zellen können Abb. 4.9 entnommen werden.

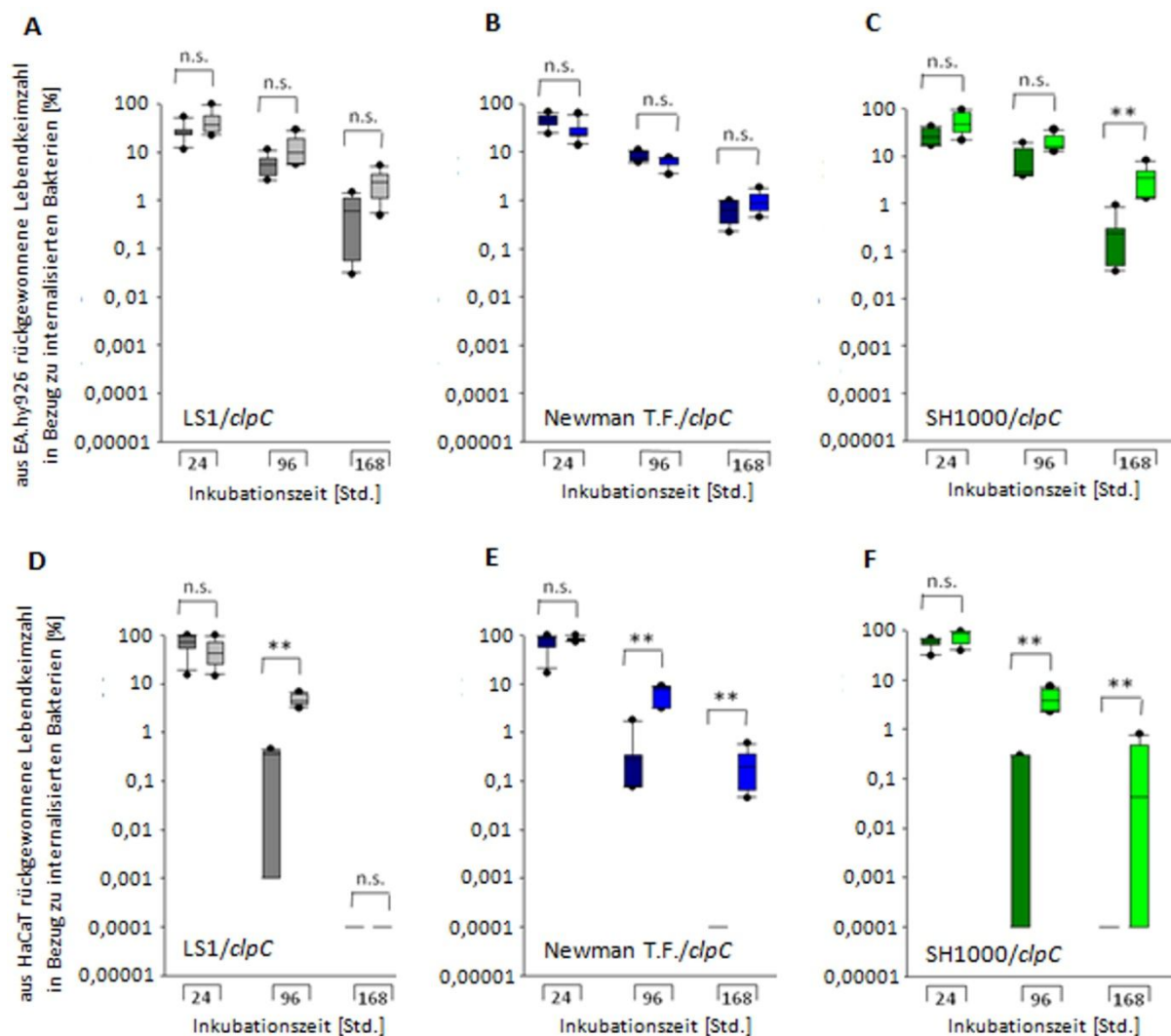


**Abb. 4.9: Internalisierung von LS1, Newman T.F. und SH1000 sowie den zugehörigen *clpC*-Mutanten.** Internalisierung mit einer Mol von 100 von *S. aureus* LS1, Newman T.F. und SH1000 sowie den isogenen *clpC*-Mutanten in **A)** EA.hy926 **B)** HaCaT. Nach 90 min. Co-Inkubation mit den eukaryoten Zellen erfolgte ein Lysotaphinverdau zu diesem Zeitpunkt noch extrazellulärer Bakterien. Die aufgenommenen Bakterien wurden anschließend durch die Lyse der eukaryoten Zellen als KBE/well im eukaryoten Zelllysat ermittelt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen, jeweils in Duplikaten durchgeführten Experimenten. n.s. nicht signifikant (Wilcoxon Rangsummentest).

Die Testung der Internalisierungsfähigkeiten der isogenen Stammpaare in die beiden eukaryoten Zelltypen erbrachten wieder klare Unterschiede in Hinblick auf den Empfängerzelltyp. Ähnlich wie schon für das Stammpaar DSM20231/*clpC* (Kap. 4.3.1) beobachtet, internalisierten, mit Ausnahme von Newman T.F./*clpC*, tendenziell mehr Bakterien in die endotheliale Zelllinie EA.hy926 (Abb. 4.9 A) als in die epitheliale Zelllinie HaCaT (Abb. 4.9 B). Beim Vergleich der Internalisierungsfähigkeiten der bakteriellen Stammpaare hingegen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, auch wenn das Isolat SH1000 tendenziell besser in EA.hy926-Zellen zu internalisieren vermochte als die entsprechende *clpC*-Mutante und die *clpC*-Mutante des Stammes Newman T.F. tendenziell stärker in HaCaT-Zellen internalisierte als der Wildtyp.

#### 4.4.3 Untersuchung der intrazellulären Persistenz von LS1, Newman T.F. und SH1000 sowie den jeweiligen *clpC*-Mutanten

Den Box- und Whiskerplots in Abb. 4.10 können die Resultate zur intrazellulären Persistenz der Stämme LS1, Newman T.F. und SH1000 sowie den entsprechenden *clpC*-Mutanten entnommen werden.

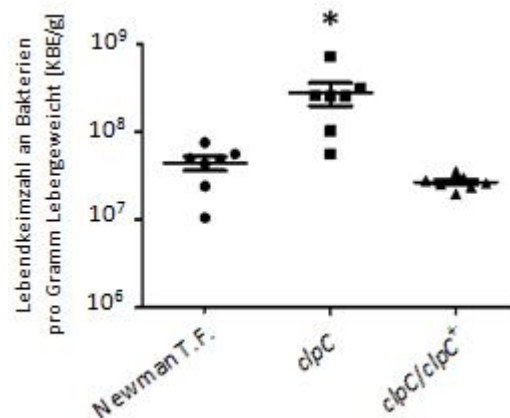


**Abb. 4.10: Intrazelluläre Persistenz von LS1, Newman T.F. und SH1000 sowie den *clpC*-Mutanten.** Nach der Internalisierung (Moi 100) wurden die eukaryoten Zelllinien **A-C)** EA.hy926 und **D-F)** HaCaT in Anwesenheit von Antibiotika für 24, 96 und 168 Std. inkubiert und die intrazellulär persistierenden Bakterienzellen im Anschluss mittels Lyse der eukaryoten Zellen rückgewonnen und die KBE/ml bestimmt. Dargestellt ist die intrazelluläre Persistenz von *S. aureus* LS1 (■), LS1 *clpC* (□), Newman T.F. (■), Newman T.F. *clpC* (□), SH1000 (■) und SH1000 *clpC* (■) in Prozent [%] zur Gesamtmenge der nach 90 min Co-Inkubation intrazellulär lokalisierten Bakterien. Die Daten dreier unabhängigen, in Duplikaten durchgeführter Experimente sind als Box- und Whiskerplot dargestellt. n.s. nicht signifikant; \*\*  $P < 0.01$  im Vergleich zum WT (Wilcoxon Rangsummentest).

Die signifikant höheren Bakterienzahlen, die beim Stammpaar DSM20231/*clpC* (Kap. 4.3.2) in beiden eukaryoten Zelltypen für die *clpC*-Mutante (PBM001) nach 96 und 168 Std. beobachtet werden konnten, wurden in den anderen Stammpaaren nur zum Teil sichtbar. Ähnlich wie bei DSM20231/*clpC* war nach 24 Std. intrazellulärer Lokalisation in allen drei Stammpaaren keine signifikanten Unterschiede in der intrazellulären Überlebensfähigkeit in beiden eukaryoten Zelltypen zu detektieren. Nach 96 und 168 Std. zeigten die *clpC*-Mutanten der Stämme LS1 und SH1000 jedoch höhere Überlebensraten in den EA.hy926-Zellen als die entsprechenden Wildtypen (jedoch nur für SH1000 *clpC* für den Zeitpunkt 168 Std. signifikant), während Stamm Newman T.F. und seine *clpC*-Mutante zu beiden Zeitpunkten vergleichbar hohe Persistenzraten aufwiesen (Abb. 4.10 A-C). In HaCaT-Zellen hingegen überlebten alle drei *clpC*-Mutanten nach 96 Std. Co-Kultur signifikant besser als die entsprechenden Wildtyp-Stämme und dieser Trend war in den Newman T.F. und SH1000 *clpC*-Mutanten auch nach 168 Std. noch sichtbar (Abb. 4.10 D-F). Zudem konnte auch mit diesen Stammpaaren, ähnlich wie beim Stammpaar DSM20231/*clpC*, eine erhöhte Klärungsrate der intrazellulär persistierenden Bakterien in HaCaT-Zellen über die Zeit beobachtet werden, in der im Durchschnitt nach 168 Std. Co-Kultur nur noch 0,01% der nach 90 min Co-Inkubation aufgenommenen Bakterien reisoliert wurden, während in EA.hy926-Zellen zum gleichen Zeitpunkt noch ca. 1% der ursprünglich nach 90 min Co-Inkubation aufgenommenen Bakterien in einem kultivierbaren Zustand wiedergefunden werden konnten.

#### **4.5 Untersuchung zur *in vivo* Überlebensfähigkeit von Newman T.F. *clpC***

Es konnte eine signifikant verbesserte intrazelluläre Persistenz von Newman T.F. *clpC* im Vergleich zum Wildtyp nach 96 und 168 Std. in der Keratinozytenzelllinie HaCaT dargestellt werden (Kap. 4.4.3). Aus diesem Grund sollte weiterführend die Überlebensfähigkeit dieser *clpC*-Mutante *in vivo* untersucht werden. Die Ergebnisse hierzu können Abb. 4.11 entnommen werden.

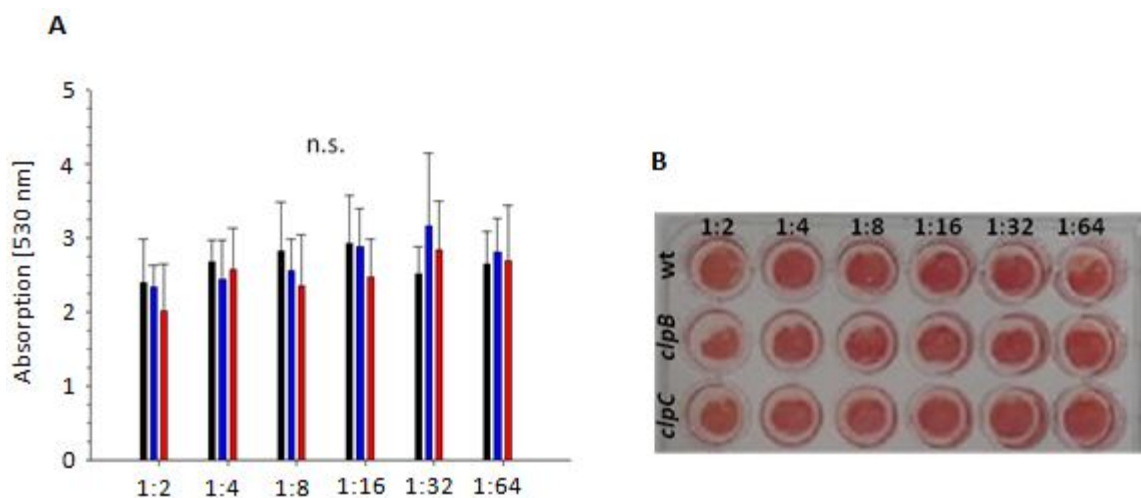


**Abb. 4.11: Einfluss der *clpC* Mutation auf die Infektiosität des Stammes Newman T.F. in einem Maus-Abszessmodell.** Es wurden 8 Wochen alten weiblichen C57Bl/6N Mäusen  $1 \times 10^7$  KBE/100  $\mu$ l einer Bakteriensuspension des Wildtyp-Stammes Newman T.F., der Mutante Newman T.F. *clpC* oder der Komplementante Newman T.F. *clpC/clpC<sup>+</sup>*, unter Narkose retro-orbital injiziert. 4 Tage nach der Infektion wurden die Tiere unter Narkose getötet und nachfolgend die Leber entnommen. Ca. 200 mg der frisch entnommenen Leber wurden je Versuchstier homogenisiert und die Lebendkeimzahl als KBE/g Leber bestimmt ( $n=7$ ). \*  $P < 0.05$  im Vergleich zum WT und der Komplementante (Wilcoxon Rangsummentest).

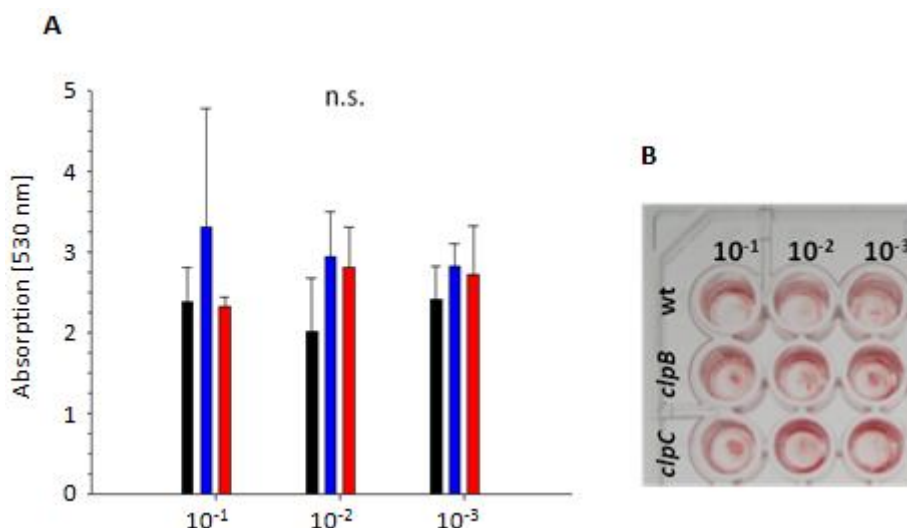
Bei Betrachtung von Abbildung 4.11 ist erkennbar, dass 4 Tage nach Inokulation der Mäuse eine im Vergleich zum Wildtyp-Stamm Newman T.F. signifikant erhöhte Anzahl lebender Zellen aus den Lebern der mit der Newman T.F. *clpC*-Mutante behandelten Mäuse isoliert werden konnte. Dies waren mit ca.  $5 \times 10^8$  KBE/g Leber im Durchschnitt ca. 10-mal mehr Zellen der *clpC*-Mutante. Die aus der Leber isolierte Menge der Komplementante Newman T.F. *clpC/clpC<sup>+</sup>* lag dagegen mit ca.  $5 \times 10^7$  KBE/g Leber im Bereich des Wildtyps. Die Versuchstiere hatten bei ihrer Lieferung im Schnitt ein Gewicht von ca. 20 g, von dem sie im Verlauf der Infektion 2 bis 4 g verloren. Neben der KBE/g Leber-Bestimmung erfolgten Gewebeentnahmen der Leber, Niere, Milz und Lunge für histologische Zwecke. Diese wurden in der Histologie des Universitätsklinikum des Saarlandes auf die Bildung von Abszessen hin untersucht. Von diesen Materialien konnten jedoch, aufgrund der großen Nachfrage an histologischen Untersuchungen anderer klinischer Einrichtungen, bis dato noch keine Schnitte zurückerhalten werden.

## 4.6 Untersuchungen zur Biofilmbildung von DSM20231 *clpB* und DSM20231 *clpC*

Neben der Invasion in die Wirtszelle ist die Biofilmbildung ein weiterer wichtiger Mechanismus für *S. aureus* um erfolgreich im Wirt persistieren zu können. Im Folgenden wurde daher die Biofilmbildung von DSM20231 sowie der entsprechenden *clpB*- und *clpC*-Mutanten (PBM001) auf zwei unterschiedliche Weisen untersucht. Die daraus entstandenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.12 und 4.13 graphisch und bildlich dargestellt.



**Abb. 4.12: Biofilmbildung der DSM20231 *clpB* und *clpC* Derivate in 24-well Schalen.** Ausgehend von auf Schafsblutagar gewachsenen Kolonien wurde ein McFarland (McF) von 0,5 eingestellt und davon die Verdünnungen 1:2 bis 1:64 verwendet, um mit 1% Glucose versetztes TSB (Tryptic Soy Broth) in einer 24-well Schale zu inokulieren und diese unter statischen Bedingungen zu inkubieren. Die Auswertung erfolgte nach 24 Std. bei 37°C, nach Waschen der wells mit 1xPBS, Färbung des Biofilms mit Safranin und anschließender Messung der Absorption des durch Essigsäure aus dem Biofilm herausgewaschenen Safranins bei 530 nm. **A)** Quantitative Darstellung der Biofilmbildung durch Messung der Absorption bei 530 nm. DSM20231 (■), DSM20231 *clpB* (■) und PBM001 (DSM20231 *clpC*; ■). **B)** Bildliche Darstellung der Biofilmbildung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant im Vergleich zwischen WT und Mutanten (t-Test).



**Abb. 4.13: Biofilmbildung der DSM20231 *clpB* und *clpC* Derivate in 96-well Schalen.** Die *S. aureus* Kulturen wurden in TSB kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  0,2) wurden die Kulturen  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$  verdünnt und mit diesen Verdünnungen TSB mit 2,5% Glucose in einer 96-well Schale inokuliert. Die Auswertung erfolgte nach 24 Std. bei 37°C, nach Waschen der wells mit 1xPBS, Färbung des Biofilms mit Safranin und anschließender Messung der Absorption des durch Essigsäure aus dem Biofilm herausgewaschenen Safranins bei 530 nm. **A)** Quantitative Darstellung der Biofilmbildung durch Messung der Absorption bei 530 nm. DSM20231 (■), DSM20231 *clpB* (■) und PBM001 (DSM20231 *clpC*; ■). **B)** Bildliche Darstellung der Biofilmbildung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant im Vergleich zwischen WT und Mutanten (t-Test).

Bei der Untersuchung der Biofilmbildung konnte in beiden Experimenten kein markanter Unterschied zwischen DSM20231 und den *clpB*- und *clpC*-Mutanten beobachtet werden. Bei den einzelnen Experimenten waren auch zwischen den eingesetzten Bakterienverdünnungen keine Unterschiede erkennbar.

#### 4.7 Untersuchung möglicher Ursachen für die intrazelluläre Persistenz von DSM20231 *clpC*

In einem weiteren Abschnitt dieser Dissertation sollte eine mögliche Ursache für die beobachtete verbesserte intrazelluläre Persistenz von PBM001 (DSM20231 *clpC*) im Vergleich zum Wildtyp identifiziert werden. Dafür wurden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen. Es wurde zum Einen der Einfluss von DSM20231 und seiner *clpC*-Mutante auf die Apoptose beider verwendeter eukaryoter Zelllinien hin untersucht. Zum Anderen wurde die Auswirkung der *clpC* Inaktivierung auf den programmierten Zelltod des Bakteriums untersucht. Des Weiteren wurde die Transkription von an der Virulenz von *S.*

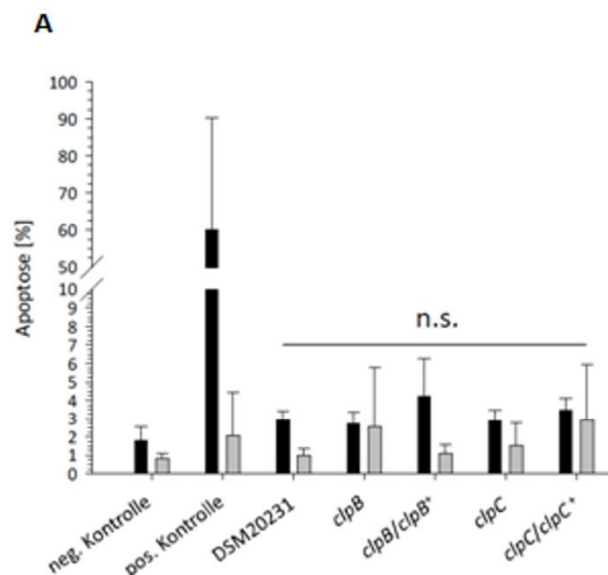


*aureus* beteiligter Regulatoren bzw. in der Protein-Homöostase aktiver Faktoren, wie ClpB, aus internalisierten und intrazellulär persistierenden DSM20231 und PBM001 Zellen näher charakterisiert.

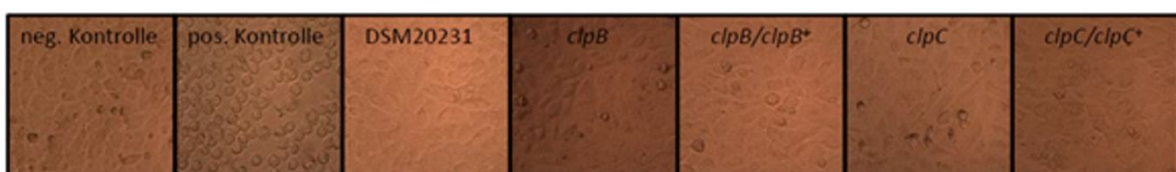
#### 4.7.1 Einfluss der *clpC* Inaktivierung in DSM20231 auf die Apoptose

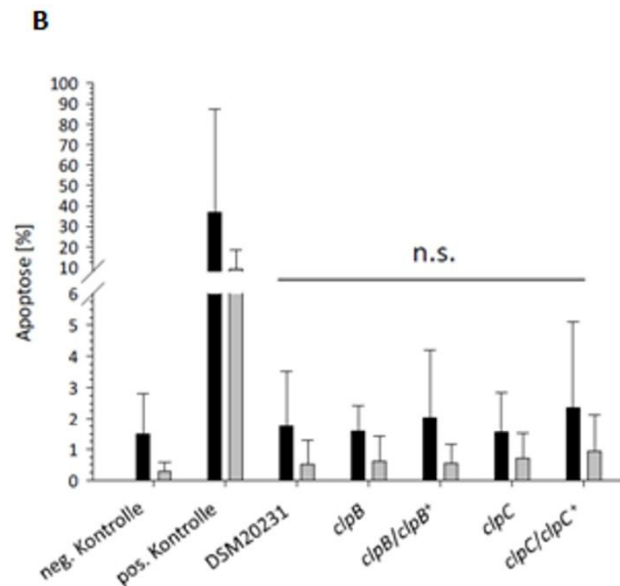
Der apoptotische Zelltod eukaryoter Zellen ist u.a. ein Merkmal für die Aktivität des  $\alpha$ -Toxins ( $\alpha$ -Hämolysins) von *S. aureus* [Giese *et al.*, 2011; Haslinger-Löffler *et al.*, 2005; Schröder *et al.*, 2006; Sinha & Fraunholz, 2010]. Es wurde vermutet, dass die *clpC* Inaktivierung in *S. aureus* in einer verringerten Aktivität des  $\alpha$ -Hämolysins resultiert. Dies würde wiederum zu keiner bzw. einer schwächeren Apoptose der beiden eukaryoten Zelllinien EA.hy926 und HaCaT führen. Dadurch würden Zellen der *clpC*-Mutante im Gegensatz zu Wildtyp Zellen nicht bzw. zu einem geringeren Anteil nach dem eukaryoten Zelltod in das umgebende Medium mit Antibiotika des Apoptose-Assays freigesetzt werden, wodurch es zu dem beobachteten erhöhten intrazellulären Überleben kommt.

Die Bestimmung des bakteriellen Effektes der *S. aureus* Stämme DSM20231, DSM20231 *clpB*, DSM20231 *clpB/clpB*<sup>+</sup>, PBM001 (DSM20231 *clpC*) sowie DSM20231 *clpC/clpC*<sup>+</sup> auf die Apoptose von EA.hy926- und HaCaT-Zellen kann Abb. 4.14 entnommen werden.

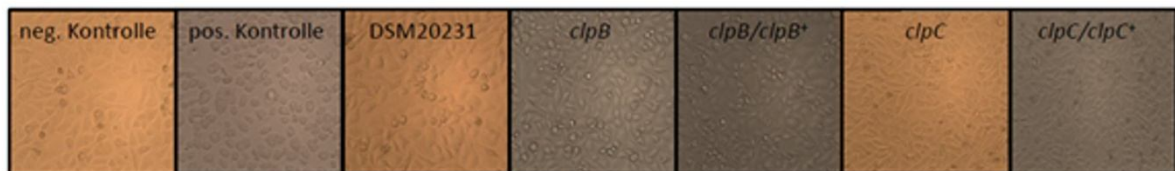


Zu A lichtmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 100x





Zu B lichtmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 100x



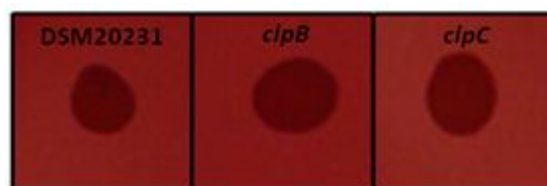
**Abb. 4.14: Einfluss von DSM20231, DSM20231 *clpB* und DSM20231 *clpC* auf die Apoptose.** Einfluss der bakteriellen Co-Kultivierung auf die frühe Apoptose (■) und späte Apoptose/Nekrose (□) von **A)** EA.hy926- und **B)** HaCaT-Zellen. Die eukaryoten Zellen wurden mit den Stämmen DSM20231, DSM20231 *clpB*, PBM001 (DSM20231 *clpC*) sowie der Komplementanten DSM20231 *clpB/clpB<sup>+</sup>* und DSM20231 *clpC/clpC<sup>+</sup>* mit einer Mol von 100 infiziert, 90 min co-inkubiert und extrazellulär verbliebene Bakterien im Anschluss durch einen einstündigen Lysostaphinverdau eliminiert. Danach wurden die eukaryoten Zellen mit internalisierten Bakterien für 24 Std. in Vollmedium ohne Antibiotika inkubiert. Der Einfluss der internalisierten Bakterien auf die frühe Apoptose wurde anschließend durch Färbung der eukaryoten Zellen mit Annexin V-APC und die späte Apoptose, bzw. Nekrose mit Propidiumiodid per Durchflusszytometrie bestimmt. Die Kontrollen wurden identisch zu den eukaryoten Zellen mit Co-Inkubation von *S. aureus* behandelt. neg. Kontrolle: EA.hy926 bzw. HaCaT ohne intrazelluläre Bakterien, pos. Kontrolle: EA.hy926 bzw. HaCaT ohne intrazelluläre Bakterien für 20 min mit 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Die Daten der Kontrollen repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen, in Duplikaten durchgeführter Experimente. n.s. nicht signifikant im Vergleich zum WT (Wilcoxon Rangsummentest).

Die mikroskopischen Aufnahmen ließen mit Ausnahme der positiv Kontrollen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bei beiden verwendeten eukaryoten Zelllinien, EA.hy926 (Abb. 4.14 A) und HaCaT (Abb. 4.14 B), keine morphologischen Unterschiede nach der bakteriellen Infektion und Co-Inkubation mit DSM20231 und den entsprechenden Mutanten/Komplementanten erkennen. Bei den positiv

Kontrollen konnten für beide eukaryote Zelltypen nach der Behandlung mit 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine deutliche Abkuglung der Zellen aufgezeigt werden. Zudem konnten durch diese Behandlung ca. 60% der EA.hy926-Zellen mit Annexin V-APC angefärbt werden, jedoch nur ca. 2% mit Propidiumiodid (Abb. 4.14 A). Die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten HaCaT-Zellen ließen sich zu ca. 40% mit Annexin V-APC bzw. zu ca. 10% mit Propidiumiodid anfärben (Abb. 4.14 B). Bei den mit den unterschiedlichen DSM20231 Derivaten infizierten eukaryoten Zellen hingegen zeigten sich keine klaren Unterschiede im Anfärbeverhalten der Zellen mit Annexin V-APC und Propidiumiodid. Generell war die frühe Apoptose mit 2,7 bis 4,2% bei EA.hy926 und 1,5 bis 2,3% bei HaCaT bei allen intrazellulär lokalisierten *S. aureus* Stämmen etwas höher als die späte Apoptose, bzw. Nekrose, die mit 1 bis 2,9% für EA.hy926 und 0,5 bis 0,9% für HaCaT ermittelt wurde. Sowohl bei EA.hy926 mit 0,8% für die frühe und 1,8% für die späte Apoptose als auch bei HaCaT mit ca. 0,3 für die frühe und 1,5% für die späte Apoptose lagen die ermittelten Werte [%] der negativ Kontrollen nach 24 Std. in Bereichen der für die eukaryoten Zellen mit intrazellulär lokalisierten Bakterien bestimmten Werte.

#### 4.7.1.1 Einfluss der *clpC* Inaktivierung auf die $\alpha$ -Hämolysin Aktivität von DSM20231

Zum Test auf die Aktivität des  $\alpha$ -Hämolysins wurde eine Zellzahl von ca.  $10^8$  Bakterienzellen/ml pro verwendeten Bakterienstamm eingesetzt. Von dieser wurden je 2,5  $\mu$ l auf eine TS (Tryptic Soy)-Agarplatte mit 5% Kaninchenblut getropft. Die daraus entstandenen Lysehöfe nach 24 Std. Inkubation bei 37°C können Abbildung 4.15 entnommen werden.



**Abb. 4.15:  $\alpha$ -Hämolysin Aktivität von DSM20231, DSM20231 *clpB* und DSM20231 *clpC* (PBM001).** Es wurde eine Zellzahl von ca.  $10^8$  Bakterienzellen/ml verwendet und davon auf eine TS-Agarplatte mit 5% Kaninchenblut 2,5  $\mu$ l gespottet. Nach 24 Std. bei 37°C erfolgte die Bilddokumentation. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von 3 durchgeführten Experimenten.

Auf der TS-Agarplatte mit 5% Kaninchenblut war nach 24 Std. Inkubation bei 37°C weder bei DSM20231 noch bei DSM20231 *clpB* und PBM001 (DSM20231 *clpC*) ein klarer Lysehof

erkennbar, was darauf schließen lässt, dass weder der Wildtyp, noch seine *clp*-Mutanten eine markante  $\alpha$ -Hämolysin Expression aufweisen (Abb. 4.15).

#### 4.7.2 Einfluss der *clpC* Inaktivierung in DSM20231 auf den bakteriellen Zelltod über das MazEF Toxin-Antitoxin System

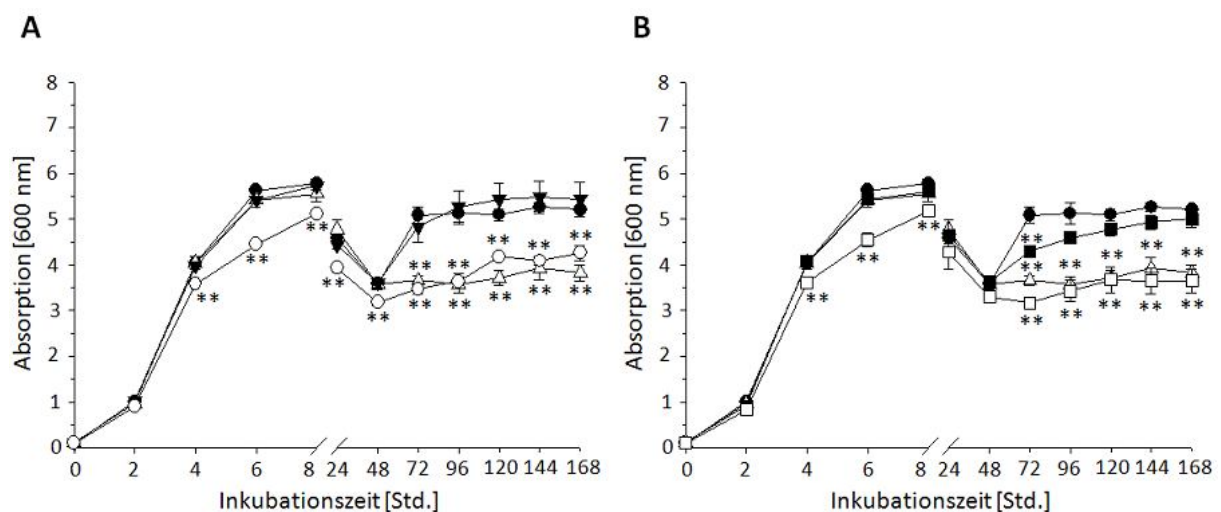
Vom MazEF System ist bekannt, dass ClpC für den Abbau des Antitoxins MazE verantwortlich ist. Dies resultiert in einer erhöhten Menge an Toxin MazF, welche zum bakteriellen Zelltod führt. Donegan *et al.* [2010] äußerten die Vermutung, die Ursache an dem verbesserten Überleben von *S. aureus* PBM001 (DSM20231 *clpC*) könnte an der permanenten Inaktivierung der Toxine der von diesem Organismus produzierten Toxin-Antitoxinsysteme liegen, die aufgrund der fehlenden Antitoxin-Proteolyse durch ClpC auftritt.

Des Weiteren sind die für das MazEF Toxin-Antitoxin System kodierenden Gene Teil des  $\sigma^B$ -Operons dieses Organismus [Fu *et al.*, 2007].

In diesem Zusammenhang wurde eine Charakterisierung des Einflusses der *clpC* Inaktivierung in *S. aureus* DSM20231 auf das MazEF Toxin-Antitoxin System und den alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^B$  vorgenommen.

#### 4.7.2.1 Bestimmung des Langzeitwachstum und der Lebendkeimzahl

Auf den Abbildungen 4.16 sind die Wachstumskurven für A DSM20231, die beiden Einzelmutanten PBM001 (DSM20231 *clpC*), DSM136 (DSM20231  $\Delta mazEF$ ) und die Doppelmutante DSM136 *clpC* (DSM20231 *clpC*  $\Delta mazEF$ ) sowie für B DSM20231, PBM001 sowie MB290 (DSM20231 *sigB*) und MB288 (DSM20231 *clpC sigB*) dargestellt. Die aus denselben Proben ermittelte Lebendkeimzahlen können den Abbildungen 4.17 entnommen werden.

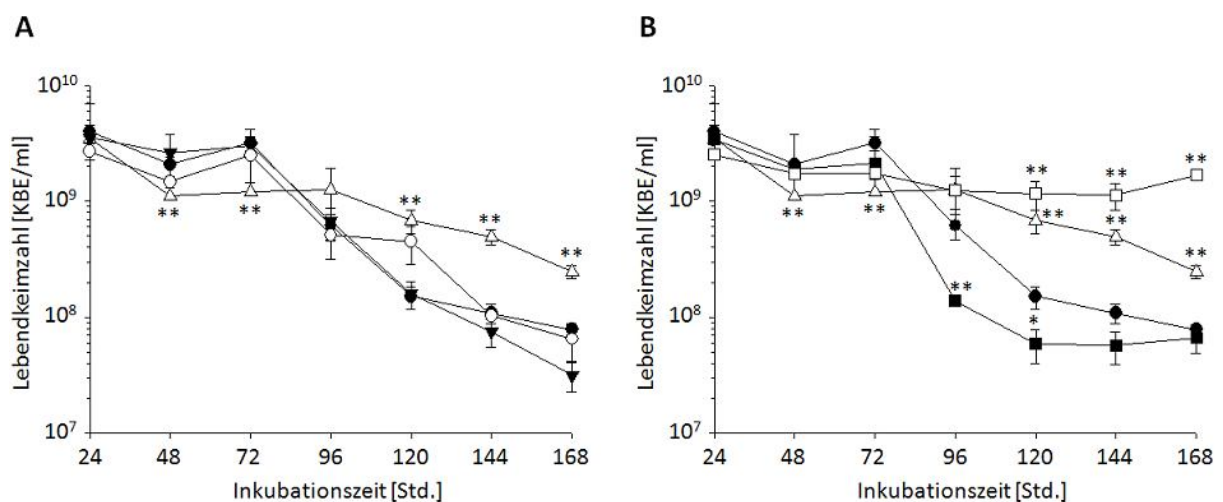


**Abb. 4.16: Langzeitwachstum der *clpC*-, *mazEF*- sowie *sigB*- Einzel- und Doppelmutanten.** Bestimmung des Langzeitwachstums über einen Zeitraum von 7 Tagen in BHI bei 37°C und 230 rpm. Das Wachstum wurde durch Probenentnahme zu den angegebenen Zeitpunkten und Messung der Absorption bei 600 nm bestimmt. **A)** DSM20231 (◆), PBM001 (DSM20231 *clpC*; ▲), DSM136 (DSM20231  $\Delta mazEF$ ; ●) und DSM136 *clpC* (DSM20231 *clpC*  $\Delta mazEF$ ; ◻). **B)** DSM20231 (◆), PBM001 (▲), MB290 (DSM20231 *sigB*; ●) und MB288 (DSM20231 *clpC sigB*; ◻). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler von 6 unabhängigen Experimenten. \*\*  $P < 0.01$  im Vergleich zwischen WT und Mutante (Wilcoxon Rangsummentest).

Wie bereits in Kapitel 4.1.3 näher beschrieben, weist der Wildtyp DSM20231 von 8 auf 48 Std. zunächst eine starke Abnahme in der Absorption bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 5,5 auf 3,5 auf, um nach 72 Std. Wachstum eine deutliche Zunahme in der  $OD_{600}$  von +1,5, den sogenannten „regrowth“ der Bakterienzellen, vorzuweisen. Ebenfalls in Kapitel 4.1.3 näher erläutert, ist für PBM001 (DSM20231 *clpC*) nach Abnahme der Zelldichte von 8 auf 48 Std., anstelle des „regrowth“ nach 72 Std., eine gleich bleibende Absorption bei 600 nm bis zum Ende der Messung bei 168 Std. erkennbar (Abb. 4.16 A und B).

Die DSM20231  $\Delta mazEF$ -Mutante (DSM136) verhielt sich während des gesamten Wachstums über 7 Tage nahezu identisch zum Wildtyp (Abb. 4.16 A). Im Gegensatz dazu war für die Doppelmutante DSM20231 *clpC*  $\Delta mazEF$  (DSM136 *clpC*) über den nahezu gesamten Zeitraum im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringerte Absorptionswerte erkennbar. Schon nach 4 Std. wies die *clpC*  $\Delta mazEF$ -Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich verlangsamtes Wachstum auf. Von 8 auf 48 Std. zeigte die DSM136 *clpC* Kultur jedoch wie der Wildtyp eine starke Abnahme der Zelldichte um ca. 2 Einheiten, um dann in den darauf folgenden späten Wachstumsphasen (72 bis 168 Std.) wieder einen „regrowth“ aufzuweisen, der aber im Vergleich zum Wildtyp weniger stark ausfiel.

Die Einzelmutante MB290 (DSM20231 *sigB*) verhielt sich während des gesamten Wachstums ähnlich wie DSM20231 (Abb. 4.16 B); zeigte nach 72 Std. jedoch keinen so ausgeprägten „regrowth“ wie der Wildtyp und hatte deshalb für die gesamte späte Wachstumsphase (72 bis 168 Std.) eine geringere Zelldichte, die jedoch nicht signifikant unterschiedlich zum Wildtyp war. Die DSM20231 *clpC* *sigB*-Doppelmutante (MB288) wies, vergleichbar zu der *clpC*  $\Delta mazEF$ -Mutante, bereits nach 4 Std. Inkubation ein im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringertes Wachstum auf. Ähnlich wie der Wildtyp wiesen die Kulturen der *clpC* *sigB*-Doppelmutante zwischen 24 und 48 Std. eine deutliche Abnahme der Absorption bei 600 nm von ca. 5 auf 3,3 auf, blieben aber über den restlichen Wachstumsverlauf auf dem niedrigen Zelldichteniveau der *clpC*-Mutante PBM001 und wiesen ebenfalls wie diese keinen ausgeprägten „regrowth“ auf.



**Abb. 4.17: Lebendkeimzahlbestimmung der *clpC*-, *mazEF*- sowie *sigB*- Einzel- und Doppelmutanten.** Die Kulturen des Wildtyp und der isogenen Mutanten wurden in BHI bei 37°C und 230 rpm inkubiert und aus diesen über einen Zeitraum von 24 bis 168 Std. Proben für die Bestimmung der Lebendkeimzahl als KBE/ml

entnommen. **A)** DSM20231 ( $\blacklozenge$ ), PBM001 (DSM20231 *clpC*;  $\blacktriangleleft$ ), DSM136 (DSM20231  $\Delta mazEF$ ;  $\blacktriangleright$ ) und DSM136 *clpC* (DSM20231 *clpC*  $\Delta mazEF$ ;  $\blacklozenge$ ). **B)** DSM20231 ( $\blacklozenge$ ), PBM001 ( $\blacktriangleleft$ ), MB290 (DSM20231 *sigB*;  $\blacksquare$ ) und MB288 (DSM20231 *clpC* *sigB*;  $\square$ ). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler von 6 unabhängigen Experimenten. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  im Vergleich zwischen WT und Mutante (Wilcoxon Rangsummentest).

Der Wildtyp DSM20231 zeigte, wie in Kapitel 4.1.3 bereits erläutert, passend zur Wachstumskurve (Abb. 4.16), zunächst eine Abnahme der Lebendkeimzahl von 24 auf 48 Std., um dann nach einer Zunahme der KBE/ml bei 72 Std., die mit dem „regrowth“ der Bakterienzellen übereinstimmt, in die Sterbephase einzutreten. Hingegen wies die *clpC*-Mutante (PBM001) nach 72 Std. keine Zunahme der Lebendkeimzahl auf und behielt bis zum Ende der Messung nach 168 Std. eine im Vergleich zum Wildtyp höhere Zahl an lebenden Bakterienzellen bei (Abb. 4.17 A, B).

Die  $\Delta mazEF$ -Mutante (DSM136) verhielt sich, wie auch bei der Bestimmung des Langzeitwachstums (Abb. 4.16 A), während des gesamten Experiments ähnlich zum Wildtyp. Während sich die Doppelmutante DSM20231 *clpC*  $\Delta mazEF$  (DSM136 *clpC*) in den durchgeführten Experimenten zum Langzeitwachstum (Abb. 4.16 A) ähnlicher zur *clpC*-Einzelmutante verhielt, trat bei der zugehörigen Bestimmung der Lebendkeimzahl (Abb. 4.17 A) ein anderes Verhalten auf. Interessanterweise glich hier die Lebendkeimzahl über den gesamten Zeitraum mehr der des Wildtyps. Die Doppelmutante DSM136 *clpC* wies folglich in der Wachstumsperiode 24 bis 48 Std. ebenfalls eine Abnahme der KBE/ml von im Mittel  $2,7 \cdot 10^9$  auf  $1,5 \cdot 10^9$  KBE/ml auf, um anschließend, von 48 bis 72 Std., erneut auf  $2,5 \cdot 10^9$  KBE/ml anzusteigen. Danach reduzierte sich die Lebendkeimzahl der Kulturen kontinuierlich bis auf ca.  $6,5 \cdot 10^7$  KBE/ml nach 168 Std. Während jedoch die *mazEF*-Mutante DSM136 speziell in den späten Wachstumsphasen (144 und 168 Std.) ein im Vergleich zum Wildtyp schlechter werdendes Überleben aufzeigte, war nach zusätzlicher *clpC* Inaktivierung bei der Doppelmutante DSM136 *clpC* das Überleben in dieser Wachstumsperiode wiederum verbessert, bzw. auf dem Niveau des Wildtyps.

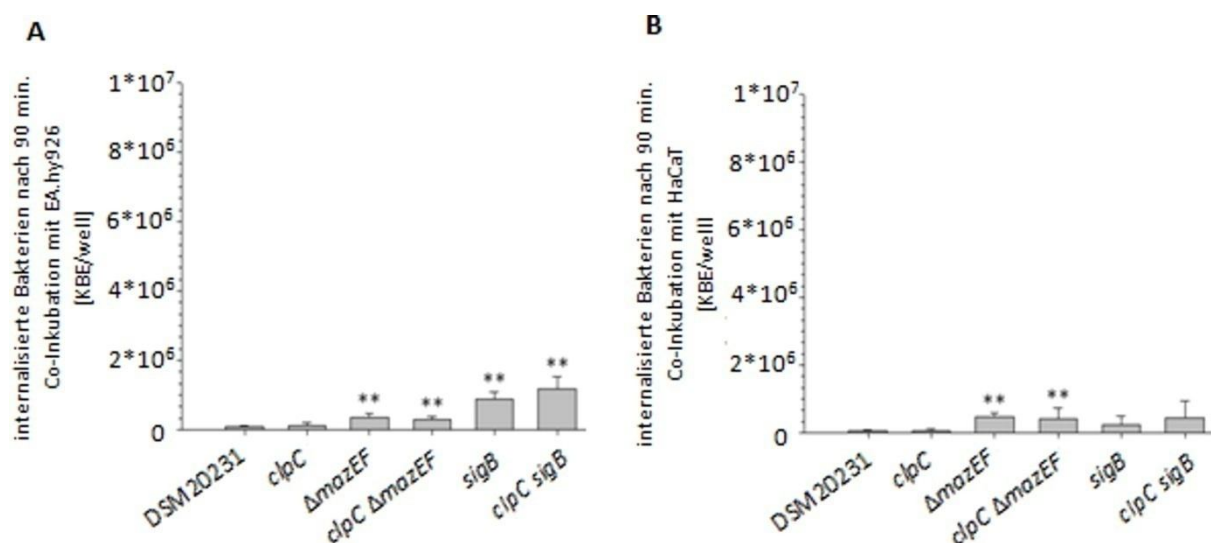
Bei Experimenten mit den *sigB*-Mutanten trat dieser Effekt noch deutlicher hervor (Abb. 4.17 B). Die Kulturen der DSM20231 *sigB*-Mutante (MB290) wiesen, wenn auch etwas schwächer, die zuvor schon für den Wildtyp beschriebene Abnahme der KBE/ml von 24 auf 48 Std. auf, um darauf bis zum Messpunkt 72 Std. nahezu konstant zu bleiben. In den darauf folgenden 48 Std. (72 bis 120 Std.) war jedoch eine deutlich raschere Abnahme der



Lebendkeimzahl im Vergleich zum Wildtyp erkennbar, die dann bis zum Messpunkt 168 Std. konstant blieb, womit sie am Ende der Messung den Bereich des Wildtyps bei ca.  $6,6 \cdot 10^7$  KBE/ml erreichte. Die Lebendkeimzahlprofile der Doppelmutante DSM20231 *clpC sigB* (MB288) zeigten dagegen in den ersten 96 Std. eine stetige, wenn auch schwache Abnahme, die dann jedoch bis zum Messpunkt 168 Std. wieder leicht zunahm. Damit wies MB288 ein deutlich verbessertes Überleben in den späten Wachstumsphasen (96 bis 168 Std.) auf, das sogar das Langzeitüberleben der *clpC*-Mutante PBM001 überstieg.

#### 4.7.2.2 Internalisierung-Assay mit DSM20231 sowie den Einzel- und Doppelmutanten von *clpC*, *mazEF* und *sigB*

Abbildung 4.18 können die Ergebnisse der Internalisierung mit DSM20231, PBM001 (DSM20231 *clpC*), DSM136 (DSM20231  $\Delta mazEF$ ), MB290 (DSM20231 *sigB*), DSM136 *clpC* (DSM20231 *clpC*  $\Delta mazEF$ ) und MB288 (DSM20231 *clpC sigB*) entnommen werden.



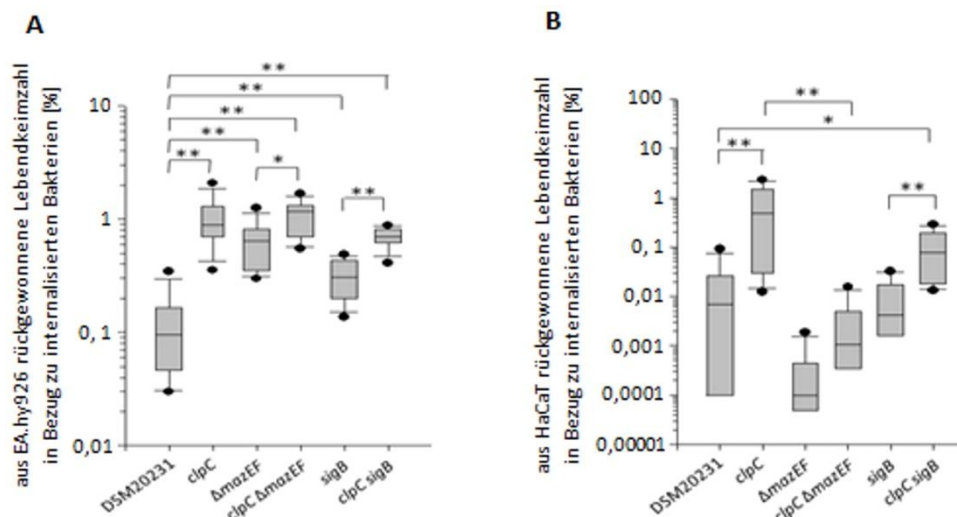
**Abb. 4.18: Internalisierung der *clpC*-, *mazEF*- sowie *sigB*- Einzel- und Doppelmutanten.** Internalisierung mit einer Mol von 100 von *S. aureus* DSM20231, PBM001 (DSM20231 *clpC*), DSM136 (DSM20231  $\Delta mazEF$ ), DSM136 *clpC* (DSM20231 *clpC*  $\Delta mazEF$ ), MB290 (DSM20231 *sigB*) und MB288 (DSM20231 *clpC sigB*) in **A**) EA.hy926 **B**) HaCaT. Nach 90 min. Co-Inkubation mit den eukaryoten Zellen erfolgte ein Lysotaphinverdau zu diesem Zeitpunkt noch extrazellulärer Bakterien. Die aufgenommenen Bakterien wurden anschließend durch die Lyse der eukaryoten Zellen als KBE/well im eukaryoten Zelllysat ermittelt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 unabhängigen, jeweils in Duplikaten durchgeführten Experimenten. \*\*  $P < 0.01$  im Vergleich zum WT (Wilcoxon Rangsummentest).



Die Internalisierung des Wildtyps DSM20231 und der *clpC*-Mutante (PBM001) war, wie bereits in Abschnitt 4.3.1 dokumentiert, sowohl in die Endothelzelllinie EA.hy926 (Abb. 4.18 A) als auch in die Keratinozytenzelllinie HaCaT (Abb. 4.18 B) nahezu identisch. Sowohl die  $\Delta mazEF$ -Mutante (DSM136) als auch die *clpC*  $\Delta mazEF$ -Doppelmutante (DSM136 *clpC*) internalisierten hingegen in beide eukaryote Zelltypen statistisch signifikant besser als der Wildtyp DSM20231. Die Zellen der *sigB*- (MB290) und *clpC sigB*- (MB288) Mutanten zeigten bei der Internalisierung in EA.hy926-Zellen im Vergleich zum Wildtyp eine noch stärkere und signifikant erhöhte Invasivität, die jedoch in HaCaT-Zellen nicht zu beobachten war. Zwar zeigten beide Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auch hier eine verstärkte Invasivität, die aber statistisch nicht signifikant war.

#### 4.7.2.3 Untersuchung der intrazellulären Persistenz von DSM20231 sowie den Einzel- und Doppelmutanten von *clpC*, *mazEF* und *sigB*

Den Box- und Whiskerplots in Abb. 4.19 können die Resultate zur intrazellulären Persistenz der Stämme DSM20231, PBM001 (DSM20231 *clpC*), DSM136 (DSM20231  $\Delta mazEF$ ), DSM136 *clpC* (DSM20231 *clpC*  $\Delta mazEF$ ), MB290 (DSM20231 *sigB*) und MB288 (DSM20231 *clpC sigB*) entnommen werden.



**Abb. 4.19: Intrazelluläre Persistenz der *S. aureus* DSM20231 Derivate nach 168 Std. Co-Inkubation.** Nach der Internalisierung (Mol 100) wurden die eukaryoten Zelllinien **A)** EA.hy926 und **B)** HaCaT in Anwesenheit von Antibiotika für 24, 96 und 168 Std. inkubiert und die intrazellulär persistierenden Bakterienzellen im Anschluss mittels Lyse der eukaryoten Zellen rückgewonnen und die KBE/ml bestimmt. Dargestellt ist die intrazelluläre Persistenz von *S. aureus* PBM001 (DSM20231 *clpC*), DSM136 (DSM20231  $\Delta mazEF$ ), DSM136 *clpC* (DSM20231 *clpC*  $\Delta mazEF$ ), MB290 (DSM20231 *sigB*) und MB288 (DSM20231 *clpC sigB*) in Prozent [%] zur Gesamtmenge

der nach 90 min Co-Inkubation intrazellulär lokalisierten Bakterien. Die Daten vierer unabhängigen, in Duplikaten durchgeführter, Experimente sind als Box- und Whiskerplot dargestellt. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  zwischen WT und Mutante bzw. Mutante und Doppelmutante (Wilcoxon Rangsummentest).

Aus EA.hy926-Zellen konnten im Vergleich zum Wildtyp DSM20231 für alle untersuchten Einzelmутanten, PBM001 (DSM20231 *clpC*), DSM136 (DSM20231  $\Delta mazEF$ ) und MB290 (DSM20231 *sigB*), sowie für die Doppelmutanten, DSM136 *clpC* (DSM20231 *clpC*  $\Delta mazEF$ ) und MB288 (DSM20231 *clpC* *sigB*), statistisch signifikant höhere Bakterienzahlen nach 168 Std. reisoliert werden (Abb. 4.19 A). Dabei wiesen die *clpC*-Einzelmутante PBM001 und die *clpC*  $\Delta mazEF$ -Doppelmutante DSM136 *clpC* im Vergleich zu den anderen Mutationen die höchsten Überlebensraten auf. Interessanterweise schienen die positiven Auswirkungen der Einzelmутationen auf das intrazelluläre Langzeitüberleben keine additiven Effekte hervorzurufen, da weder die *clpC*  $\Delta mazEF$ -Doppelmutante noch die *clpC* *sigB*-Doppelmutante MB288 eine im Vergleich zur *clpC* Mutante weiter erhöhte intrazelluläre Überlebensfähigkeit aufwiesen (Abb. 4.19 A).

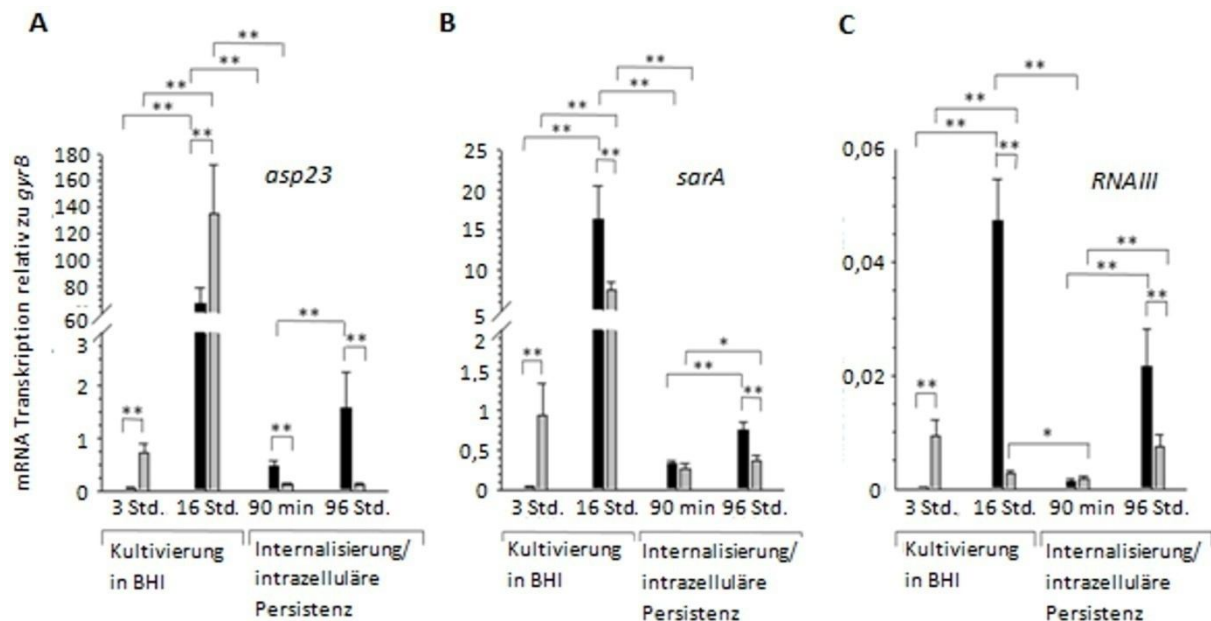
In HaCaT-Zellen zeigte sich jedoch ein weitgehend anderes Bild. Zwar konnte auch hier für die *clpC*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp wieder eine signifikant erhöhte intrazelluläre Überlebensfähigkeit nach 168 Std. Co-Kultur beobachtet werden. Anders als in der endothelialen Zelllinie wurden aber aus den mit der DSM20231  $\Delta mazEF$ -Mutante DSM136 infizierten HaCaT-Zellen nach 168 Std. Co-Inkubation im Mittel 100-fach weniger vermehrungsfähige Bakterienzellen reisoliert als aus den mit dem Wildtyp behandelten Keratinozyten, auch wenn dieser Unterschied aufgrund der hohen Interassay-Variation nicht statistisch signifikant war. Die DSM20231 *clpC*  $\Delta mazEF$ -Mutante zeigte nach 168 Std. Co-Kultur in HaCaT-Zellen eine im Vergleich zur  $\Delta mazEF$ -Mutante zwar um den Faktor 10 erhöhte Überlebensrate, blieb damit aber deutlich unter dem Niveau des Wildtyps. Zwischen der DSM20231 *sigB*-Mutante MB290 und dem Wildtyp konnte bei diesem eukaryoten Zelltyp kein klarer Unterschied in der intrazellulären Überlebensrate beobachtet werden. Bei der *clpC* *sigB*-Doppelmutante MB288 hingegen konnte, ähnlich wie mit der Endothel-Zelllinie, sowohl im Vergleich zum Wildtyp als auch im Vergleich zur *sigB*-Mutante eine signifikant verbesserte Überlebensrate in der epithelialen Zelllinie ermittelt werden. In Hinblick auf die bakteriellen Überlebensfähigkeiten in beiden eukaryoten Zelllinien konnten, wie schon in den in Abb. 4.7 und 4.10 dargestellten Resultaten ersichtlich, für die

endotheliale Zelllinie EA.hy926 eine ca. 10-fach erhöhte bakterielle Überlebensrate beobachtet werden als bei HaCaT-Zellen.

#### 4.7.3 Untersuchung zur mRNA Transkription von intrazellulär persistierenden *S. aureus* DSM20231 und DSM20231 *clpC* Zellen

Um die mRNA Transkription von intrazellulär persistierenden *S. aureus* Zellen bestimmen zu können, wurden EA.hy926-Zellen wie zuvor beschrieben mit aus 16 Std. *in vitro* Kulturen stammenden DSM20231 und PBM001 (DSM20231 *clpC*) Zellen mit einer Mol von 100 infiziert und für 90 min co-inkubiert. Die Internalisierung wurde anschließend durch einen Lysostaphinverdau gestoppt und die eukaryoten Zellen mit intrazellulär lokalisierten Bakterien in Anwesenheit von Antibiotika für 96 Std. kultiviert. Direkt nach der Internalisierungsphase (90 min.) sowie nach 96 Std. Co-Kultur erfolgten Isolierungen der Bakterien-RNA. Außerdem wurden Bakterienzellen des Wildtyps und der *clpC*-Mutante in BHI kultiviert und aus diesen nach 3 Std. (exponentielle Phase) und 16 Std. (stationäre Phase) ebenfalls RNA's isoliert.

Eine quantitative Transkriptionsanalyse mittels Real-Time PCR wurde u.a. für die Transkripte einiger globaler Regulatoren, wie *asp23* als Markergen für die Aktivität des alternativen Sigma-Faktors  $\sigma^B$  [Chan *et al.*, 1998; Gertz *et al.*, 1999; Kullik & Giachino, 1997] (Abb. 4.20 A), *sarA* [Novick, 2003] (Abb. 4.20 B) sowie *RNAIII* [Ji *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1997] (Abb. 4.20 C) durchgeführt, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie für das intrazelluläre Überleben des Bakteriums nach Aufnahme durch professionelle und nicht professionelle phagozytische Zellen des Wirtes von Bedeutung sind [Gresham *et al.*, 2000; Hasslinger-Löffler *et al.*, 2005; Kubica *et al.*, 2008; Olivier *et al.*, 2009; Voyich *et al.*, 2005; Wessen *et al.*, 1998]. Zudem wurde die Transkription zweier Virulenzfaktoren, des  $\alpha$ -Hämolysins (*hla*) [Ji *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1997] (Abb. 4.21 A) sowie Protein A (*spa*) [Bronner *et al.*, 2004; Chavakis *et al.*, 2007; Kahl *et al.*, 2005] (Abb. 4.21 B) und die Transkription einiger metabolisch bzw. in der Proteinhomöostase aktiver Faktoren, wie des negativen Hitze-Schock Regulators CtsR (*ctsR*) [Chastanet *et al.*, 2003] (Abb. 4.22 A), der Hsp100/Clp ATPase ClpB (*clpB*) [Frees *et al.*, 2004] (Abb. 4.22 B) und der Aconitase (*acnA*) [Chatterjee *et al.*, 2005] (Abb. 4.22 C), analysiert.



**Abb. 4.20: Transkriptionsanalyse einiger globaler Regulatoren von intrazellulär lokalisierten *S. aureus* nach *clpC* Inaktivierung.** Nach 3 und 16 Std. Kultivierung von DSM20231 (■) und PBM001 (DSM20231 *clpC*; ▒) in BHI sowie nach 90 min Internalisierung und 96 Std. intrazellulärer Persistenz des WT und der *clpC*-Mutante in EA.hy926-Zellen wurden Proben für die RNA-Isolierung entnommen. Die mRNA Transkription der Gene **A)** *asp23*, **B)** *sarA*, **C)** *RNAIII* wurde anschließend mittels Real-Time PCR relativ zur Expression des „housekeeping“ Gens *gyrB* quantifiziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  (Wilcoxon Rangsummentest).

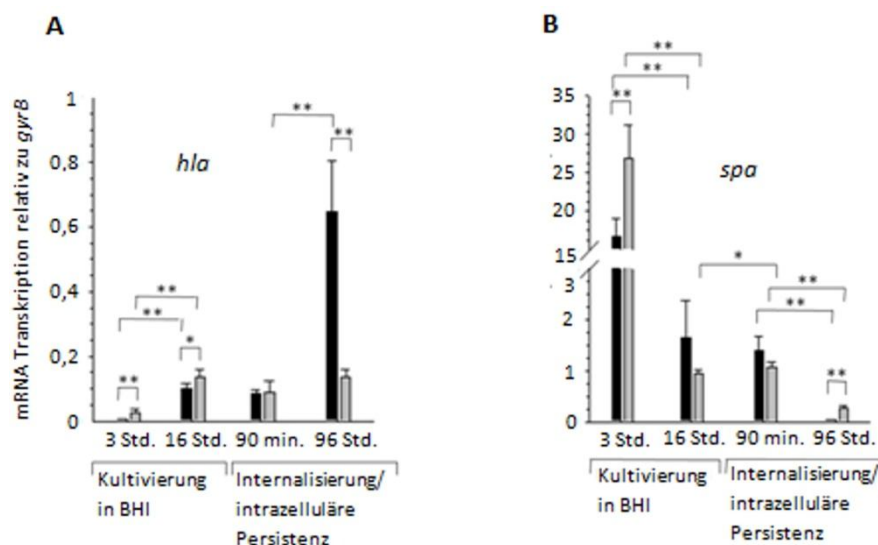
Vom alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^B$  aus *S. aureus* ist bekannt, dass dieser Sigma-Faktor unter *in vitro* Bedingungen verstärkt in den späten Wachstumsphasen aktiv ist [Bischoff *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2005]. Ebenso konnte schon gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *clpC* in dieser Spezies zu einer erhöhten Aktivität von  $\sigma^B$  und damit zu einer gesteigerten Expression von *asp23* führt [Chatterjee *et al.*, 2009b]. In Einklang mit diesen Befunden konnte auch in dieser Arbeit in den *in vitro* Kulturen eine erhöhte Transkription von *asp23* mit Zunahme der Inkubationszeit sowie in der *clpC*-Mutante beobachtet werden (Abb. 4.20 A). In den aus den EA.hy926-Zellen nach 90 min. Co-Inkubation zurückgewonnenen Bakterien hingegen zeigte sich eine im Vergleich zur 16 Std. *in vitro* Kultur klar verringerte *asp23* Transkription, die, anders als unter *in vitro* Bedingungen beobachtet, in der *clpC*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp noch einmal verringert war. Nach 96 Std. intrazellulärer Persistenz produzierte der Wildtyp im Vergleich zur mRNA Transkription nach 90 min Inkubation jedoch deutlich mehr *asp23* Transkripte, während die Transkriptionsraten für

dieses Gen in der *clpC*-Mutante zu beiden *in vivo* Zeitpunkten auf einem vergleichbar niedrigen Niveau verblieben.

Der Transkriptionsfaktor SarA gilt als einer der wichtigen globalen Regulatoren von *S. aureus*, der sowohl indirekt über die Stimulation der P2 und 3 Promotoren des *agr*-Lokus die Expression von *RNAIII* fördert als auch direkt die Expression einer Reihe wichtiger Virulenzfaktoren, wie den Proteasen, kontrolliert [Bronner *et al.*, 2004]. Frühere Untersuchungen zum intrazellulären Überleben von *S. aureus* in Polymorphonuklearen Leukozyten (PMN) weisen zudem darauf hin, dass der *sarA*-Lokus für das intrazelluläre Überleben des Bakterium in diesem Typ professioneller Phagozyten von Bedeutung ist (Gresham *et al.*, 2000). Die Expression von SarA selbst wird über drei sich überlappenden Transkripte, *sarA*, *sarB* und *sarC* gesteuert, die alle für das DNA-Bindeprotein kodieren. Während die *in vitro* Transkription von *sarA* und *sarB* in der exponentiellen Wachstumsphase maximal ist, wird *sarC* in erster Linie während der spät-exponentiellen und stationären Wachstumsphasen exprimiert [Bayer *et al.*, 1996], wobei die Aktivität des P3 Promotors von  $\sigma^B$  abhängig ist [Deora *et al.*, 1997; Manna *et al.*, 1998]. Dementsprechend und unter Berücksichtigung der Transkriptionsergebnisse von *asp23* (Abb. 4.20 A) zeigten die *in vitro* Resultate von 3 Std. (exponentielle Phase) auf 16 Std. (stationäre Phase) Kultivierung eine Zunahme der *sarA* Transkription im Wildtyp und der *clpC*-Mutante und außerdem in der exponentiellen Phase (3 Std.) eine erhöhte *sarA* Transkription in der *clpC*-Mutante, die jedoch in der stationären Phase (16 Std.) nicht mehr vorhanden war (Abb. 4.20 B). Direkt nach der Aufnahme der 16 Std. kultivierten Bakterienzellen in EA.hy926 (90 min) zeigte sich eine im Vergleich zu den 16 Std. *in vitro* Kulturen deutlich verringerte *sarA* Transkription, die im Wildtyp und der *clpC*-Mutante auf einem nahezu identischen Niveau war. Nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation produzierten der Wildtyp und die *clpC*-Mutante mehr *sarA* Transkript als nach der Internalisierung (90 min), wobei die *sarA* Synthese, gegensätzlich zu den 3 Std. aber ähnlich zu den 16 Std. *in vitro* Ergebnissen, im Wildtyp erhöht war.

Bekannterweise erfolgt unter *in vitro* Bedingungen eine starke *RNAIII* Synthese in der post-exponentiellen Wachstumsphase von *S. aureus* [Novick, 2003]. Außerdem wird das DNA Bindeprotein SarA für eine maximale *RNAIII* Expression benötigt [Cheung & Projan, 1994; Heinrichs *et al.*, 1996]. Mit diesen Befunden übereinstimmend war eine starke Zunahme der *RNAIII* mRNA Transkription im Wildtyp im Verlauf der Kultivierung von 3 auf 16 Std. zu erkennen, wobei die *RNAIII* Transkription in der *clpC*-Mutante im Gegensatz dazu von der

exponentiellen (3 Std.) auf die stationäre Wachstumsphase (16 Std.) abnahm (Abb. 4.20 C). Nach der Internalisierung (90 min) in die Endothelzelllinie EA.hy926 zeigte sich v.a. im Wildtyp eine deutliche Abnahme der *RNAIII* Transkription, die mit Zunahme der Inkubationszeit, nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation, ähnlich zu den *in vitro* Resultaten des Wildtyps anstieg. Damit in Einklang detektierten Tuchscherer *et al.* [2011] in Zellkulturexperimenten in den ersten 7 Tagen nach der Infektion der Epithelzelllinie A549 eine initiale Erhöhung der *agr* Expression, die darauffolgend (14 Tage nach Infektion) abnahm. In der *clpC*-Mutante lies sich, anders als *in vitro*, mit zunehmender intrazellulärer Lokalisation eine, wenn auch vergleichsweise zum Wildtyp geringere, Zunahme der *RNAIII* Transkription beobachten. Auffallend ist die sowohl in den *in vitro* kultivierten als auch aus EA.hy926 rückgewonnenen Bakterienzellen im allgemeinen sehr geringe *RNAIII* mRNA Transkription relativ zu *gyrB*, die auch nach dem erwähnten Anstieg nach 16 Std. Kultivierung nur ca. 0,05 betrug.

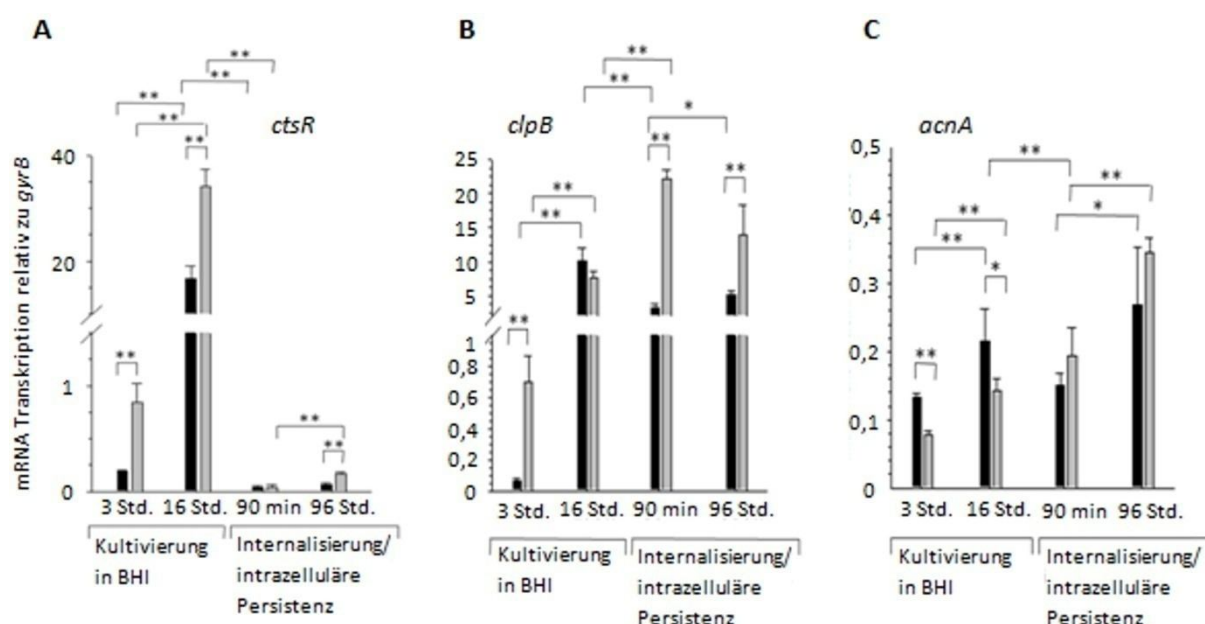


**Abb. 4.21: Transkriptionsanalyse zweier Virulenzfaktoren von intrazellulär lokalisierten *S. aureus* nach *clpC* Inaktivierung.** Nach 3 und 16 Std. Kultivierung von DSM20231 (■) und PBM001 (DSM20231 *clpC*; ▒) in BHI sowie nach 90 min Internalisierung und 96 Std. intrazellulärer Persistenz des WT und der *clpC*-Mutane in EA.hy926-Zellen wurden Proben für die RNA-Isolierung entnommen. Die mRNA Transkription der Gene **A) hla**, **B) spa** wurde anschließend mittels Real-Time PCR relativ zur Expression des „housekeeping“ Gens *gyrB* quantifiziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  (Wilcoxon Rangsummentest).

Von *S. aureus* sekretierte Proteine, wie das  $\alpha$ -Toxin (*hla*) werden vermehrt in der post-exponentiellen Wachstumsphase produziert, während in der bakteriellen Zellwand

verankerte Proteine, wie z.B. Protein A (*spa*) hauptsächlich in der exponentiellen Wachstumsphase synthetisiert werden [Recsei *et al.*, 1986; Morfeldt *et al.*, 1988]. Damit eignen sich beide Virulenzfaktoren als Indikatoren für den physiologischen Zustand des Bakteriums. In Hinblick auf die zuvor analysierten Regulatoren ist zudem bekannt, dass RNAIII die Expression von Protein A verringert, indem es durch die Bindung an die *spa* mRNA zum einen die Translation verhindert und zum anderen die *spa* mRNA degradiert [Huntzinger *et al.*, 2005]. Die Synthese von *hla* wird hingegen positiv durch RNAIII beeinflusst [Cheung *et al.*, 2004]. Tuschscherr *et al.* [2011] beschrieben außerdem eine verringerte *hla* Expression im Verlauf der Infektion einer Epithelzelllinie, die im Anschluss an die akute Infektionsphase ebenfalls wie bereits erwähnt die *agr* Expression zunahm. Mit diesen vorangehenden Resultaten übereinstimmend, zeigte sich im Wildtyp und der *clpC*-Mutante mit zunehmender Inkubationszeit von der exponentiellen (3 Std.) auf die stationäre Wachstumsphase (16 Std.) ein Anstieg in der *hla* mRNA Transkription (Abb. 4.21 A), wenngleich für die RNAIII Transkription der Mutante das Gegenteil festgestellt wurde (Abb. 4.20 C). Nach der Internalisierung in die Endothelzellen (90 min) blieb in DSM20231/*clpC* die *hla* Transkription auf dem nahezu selben Niveau wie nach 16 Std. *in vitro* Kultivierung der Bakterienzellen und nahm nach länger andauernder intrazellulärer Lokalisation (96 Std.) im Wildtyp deutlich zu, während in der *clpC*-Mutante kein klarer Unterschied zur *hla* Transkription direkt nach der Internalisierung sichtbar wurde. Damit war nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation die *hla* Transkription, ebenso wie zuvor dargestellt die RNAIII Transkription, im Wildtyp stark erhöht.

Die *spa* mRNA Transkription verhielt sich entsprechend gegensätzlich zur *hla* Transkription und war in Wildtypzellen und Zellen der *clpC*-Mutante in der stationären (16 Std.) deutlich geringer als in der exponentiellen Wachstumsphase (3 Std.) (Abb. 4.21 B). Nach 90 min Co-Inkubation mit EA.hy926 war die *spa* Produktion in den aus den EA.hy926 reisolierten Bakterienzellen nur geringfügig unterschiedlich zu der *in vitro* Produktion nach 16 Std. Kultivierung und nahm nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation im Wildtyp und der *clpC*-Mutante deutlich ab.



**Abb. 4.22: Transkriptionsanalyse einiger metabolisch bzw. in der Proteinhomöostase aktiver Faktoren von intrazellulär lokalisierten *S. aureus* nach *clpC* Inaktivierung.** Nach 3 und 16 Std. Kultivierung von DSM20231 (■) und PBM001 (DSM20231 *clpC*; ▒) in BHI sowie nach 90 min Internalisierung und 96 Std. intrazellulärer Persistenz des WT und der *clpC*-Mutante in EA.hy926-Zellen wurden Proben für die RNA-Isolierung entnommen. Die mRNA Transkription der Gene **A)** *ctsR*, **B)** *clpB* und **C)** *acnA* wurde anschließend mittels Real-Time PCR relativ zur Expression des „housekeeping“ Gens *gyrB* quantifiziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  (Wilcoxon Rangsummentest).

Bei CtsR handelt es sich um das erste Genprodukt des CtsR Regulons *ctsR-mcsA-mcsB-clpC* [Chastanet *et al.*, 2003]. Der negative Hitzeschock-Regulator CtsR verhindert die Transkription von u.a. *clpB* und *clpC* durch die spezifische Bindung an deren Promotorregionen [Derre *et al.*, 1999; Frees *et al.*, 2004], wenn die Bakterienzellen „normalen“ physiologischen Bedingungen ausgesetzt sind [Frees *et al.*, 2004]. Chatterjee *et al.* [2009b] und Frees *et al.* [2004] konnten zudem eine erhöhte *in vitro* Expression von CtsR und ClpB in *S. aureus* Zellen ohne funktionellem *clpC* aufzeigen. Da ClpC in seiner Funktion als Chaperon die aktive Konformation des Repressors CtsR aufrechterhält (siehe hierzu auch Abb. 1.4) akkumuliert der Repressor in einer inaktiven Form. Passend dazu war die *ctsR* Transkription in der *clpC*-Mutante nach 3 und 16 Std. *in vitro* Kultivierung sowie nach 96 Std. intrazellulärer Persistenz klar erhöht (Abb. 4.22 A). Die *ctsR* Synthese stieg zudem im Wildtyp und der *clpC*-Mutante mit zunehmender Kultivierungszeit an, nahm jedoch nach der Internalisierung in EA.hy926 markant auf in etwa dasselbe Level in DSM20231/*clpC* ab.



Während sich im Wildtyp nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation keine Veränderung in der *ctsR* mRNA Transkription zeigte, stieg die *ctsR* Produktion in der *clpC*-Mutante an. Entsprechend den vorherigen Befunden war die *clpB* mRNA Transkription, mit Ausnahme der 16 Std. *in vitro* Kultivierung, in der *clpC*-Mutante jeweils nach 3 Std. *in vitro* Kultivierung, nach der Aufnahme in die endotheliale Zelllinie EA.hy926 (90 min) und nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation deutlich erhöht (Abb. 4.22 B). Mit zunehmender *in vitro* Inkubationszeit von 3 auf 16 Std. war im Wildtyp und der *clpC*-Mutante ein klarer Anstieg der *clpB* Transkription erkennbar. Nach Internalisierung durch 90 min Co-Inkubation mit EA.hy926 nahm die *clpB* Produktion in Wildtypzellen ab, während sie in Zellen der *clpC*-Mutante zunahm und nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation auf dem nahezu identischen Niveau verblieb.

Von der Aconitase ist bekannt, dass sie *in vitro* unter den von Chatterjee *et al.* [2005] und in dieser Arbeit (Kap. 4.1.2) verwendeten Kultivierungsbedingungen nach 96 Std. Wachstum die höchste Aktivität erreicht und die *acnA* Transkription speziell in späteren Wachstumsphasen in der *clpC*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp verringert ist [Chatterjee *et al.*, 2005]. Diesbezüglich war die *acnA* mRNA Transkription nach 3 und 16 Std. Wachstum unter Kulturbedingungen im Wildtyp erhöht, wobei mit zunehmender Inkubationszeit im Wildtyp und der *clpC*-Mutante ein Anstieg in der *acnA* mRNA Transkription erfolgte (Abb. 4.22 C). Dagegen war innerhalb der Endothelzelllinie EA.hy926 sowohl direkt nach der Internalisierung (90 min) als auch nach 96 Std. die *acnA* Produktion in der *clpC*-Mutante leicht erhöht und stieg ebenso wie unter *in vitro* Bedingungen beobachtet mit zunehmender Inkubationszeit auch in intrazellulärer lokalisierten Bakterienzellen an.

#### 4.8 Herstellung weiterer *clp*-Mutanten im *S. aureus* Stamm DSM20231

Die ebenfalls geplanten Untersuchung des Einflusses weiterer *clp*-Mutationen (*clpL*, *clpX* und *clpY*) auf das Langzeitüberleben von *S. aureus* DSM20231 konnte nicht durchgeführt werden, da eine Konstruktion der entsprechenden Deletionsmutanten in diesem genetischen Hintergrund nicht erfolgreich war (Kap. 3.12.1). Die einzelnen *clp*-Deletionen konnten zwar in dem *S. aureus* Stamm RN4220 erzeugt werden, eine erfolgreiche Transduktion der entsprechenden Mutationen in DSM20231 konnte jedoch auch nach mehrfachen Versuchen nicht erzielt werden.

## 5 Diskussion

Obwohl der positive Einfluss der Inaktivierung der HSP100/Clp ATPase ClpC in *S. aureus* auf das Langzeitüberleben des Pathogens unter *in vitro* Bedingungen durch verschiedene Vorarbeiten schon seit geraumer Zeit gut belegt war [Chatterjee, 2005; Chatterjee *et al.*, 2005; diese Arbeit], war bis dato nicht bekannt, ob und welche Auswirkungen eine *clpC* Inaktivierung in diesem Pathogen auf das Langzeitüberleben unter *in vivo* Bedingungen ausübt. In der hier vorliegenden Dissertation konnte nun erstmals in zwei unterschiedlichen eukaryoten Zelllinien eine erhöhte intrazelluläre Persistenz verschiedener *S. aureus* Isolate mit inaktivem *clpC* dokumentiert werden. Ebenso konnte anhand eines Maus-Abszessmodells in den mit der *S. aureus clpC*-Mutante infizierten Tieren im Vergleich zum Wildtyp 4 Tage nach Infektionsbeginn eine signifikant erhöhte Bakterienzahl in den Lebern beobachtet werden. Der Nachweis eines verbesserten intrazellulären Langzeitüberlebens genetisch nicht nahe miteinander verwandter *S. aureus clpC*-Mutanten verdeutlichte zudem die Stetigkeit, mit der sich ein Fehlen von ClpC positiv auf die *in vivo* Persistenz auswirkt. Ein Effekt der beiden Clp ATPasen ClpB und ClpC auf die Internalisierung in EA.hy926- und HaCaT-Zellen hingegen wurde nicht festgestellt. Der stärkste phänotypische Unterschied in den *in vitro* Langzeitversuchen und Experimenten zur intrazellulären Persistenz zwischen den einzelnen Wild-Isolaten und ihren isogenen *clpC*-Mutanten konnte beim Stammpaar DSM20231/PBM001 beobachtet werden. Anhand durchgeführter Transkriptionsanalysen wurde beim Isolat DSM20231 eine mRNA Transkription von *RNAIII* von nahezu Null ermittelt, so dass hier ein Defekt im *agr*-System vermutet werden muss.

In *S. aureus* sowie in *B. subtilis* bildet *clpC* zusammen mit den Genen *ctsR*, *mcsA* und *mcsB* ein poly-cistronisches Operon [Chastanet *et al.*, 2003; Krüger *et al.*, 2000; Schumann *et al.*, 2002; Frees *et al.*, 2004; Wozniak *et al.*, 2012]. Unter physiologischen Bedingungen wird die Transkription dieses Operons, ebenso wie die Transkription von *clpB* und *clpP*, durch CtsR im Zusammenspiel mit ClpC reprimiert [Derre *et al.*, 1999; Frees *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2009b]. In Einklang mit diesen Beobachtungen konnte in dieser Arbeit auf Transkriptionsebene in der DSM20231 *clpC*-Mutante PBM001 eine signifikante Erhöhung der *ctsR* Transkription *in vitro* nach 3 und 16 Std. sowie nach 96 Std. Co-Inkubation mit EA.hy926-Zellen ermittelt werden. Ebenso wurde eine deutlich erhöhte *clpB* Transkription *in*

*vitro* nach 3 und 7 Std. Kultivierung als auch direkt nach der Internalisierung in die endotheliale Zelllinie EA.hy926 sowie nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation im Vergleich zu DSM20231 beobachtet (Kap. 4.1.1, Kap. 4.7.3). Die im Vergleich zu den *in vitro* Daten stark verringerte *ctsR* Transkription in DSM20231 und PBM001 direkt im Anschluss an die Internalisierung in EA.hy926 sowie 96 Std. post-Internalisierung deutet darauf hin, dass die Bakterienzellen zu diesen Messzeitpunkten weitestgehend „physiologischen“ Bedingungen innerhalb der Endothelzellen ausgesetzt sind, bei denen es zu keiner markanten Schädigung von Proteinen kommt, zu deren Schutz Klasse III Hitze-Schock Proteine (z.B. ClpB und ClpC) nötig wären. Da der Rückgang an *ctsR* enthaltenden Transkripten jedoch auch in der *clpC*-Mutante nach deren Internalisierung in EA.hy926-Zellen beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Rückgang in der *ctsR* Transkription vorrangig auf einen ClpC/CtsR unabhängigen Mechanismus zurückzuführen ist. Der 96 Std. post-Internalisierung zwischen Wildtyp und *clpC*-Mutante beobachtete Unterschied in der *ctsR* Transkription ist vermutlich auf die in der Einleitung in Kapitel 1.4.2 beschriebene ClpC-abhängige CtsR-Feedback-Regulation zurückzuführen.

In Hinblick auf das *in vitro* Langzeitüberleben von *S. aureus* beschrieben Somerville *et al.* [2002] erstmals eine tragende Funktion des Zitratzyklusenzym Aconitase (CitB) für einen post-stationären „regrowth“ (nach 72 Std.) sowie ein erhöhtes Überleben von *S. aureus citB*-Mutante-Kulturen in der stationären Wachstumsphase. Wenig später konnten Chatterjee *et al.* [2005] eine Funktion von ClpC in der Aufrechterhaltung der CitB- und dadurch Zitratzyklusaktivität in späten Wachstumsphasen und dem darauf folgenden Eintritt in die Sterbephase aufzeigen. Dagegen wies eine *clpC*-Mutante (PBM001), ähnlich zur *citB*-Mutante, ein deutlich erhöhtes Langzeitüberleben auf. Während des exponentiellen Wachstums in einem komplexen, Glucose-haltigen Medium katabolisiert *S. aureus* vorzugsweise den Zucker, um über die Glykolyse und Substratkettenphosphorylierung Energie in Form von ATP zu gewinnen und je nach Sauerstoffverfügbarkeit die Nebenprodukte Azetat (bei ausreichender Sauerstoffversorgung der Zellen) bzw. Lactat (unter Sauerstoffmangel) zu generieren [Gardner & Lascelles, 1962; Kohler *et al.*, 2003; Somerville *et al.*, 2003]. Die Abnahme lebender Zellen in der stationären Phase von 24 auf 48 Std. (Kap. 4.1.3, „Bestimmung des Langzeitwachstum und der Lebendkeimzahl von *S. aureus* DSM20231 *clpB* sowie DSM20231 *clpC*“) ist wahrscheinlich auf ein Aufbrauchen der Glucose

bzw. die Nährstofflimitation und den steigenden pH-Wert des Mediums zurückzuführen [Watson *et al.*, 1998]. Die Verarmung der Kohlenstoffquelle Glucose resultiert in einer Derepression des Zitratzyklus, durch den das in der exponentiellen Wachstumsphase unter aeroben Bedingungen akkumulierte und ins umgebende Milieu abgegeben Azetat wieder aufgenommen und intrazellulär katabolisiert wird [Somerville *et al.*, 2002]. Dementsprechend korreliert der „regrowth“ des Wildtyps und der *clpC*-Komplementante nach 72 Std. Wachstum in einem komplexen Medium mit der höchsten Aconitaseaktivität (Kap. 4.1.2) zu diesem Zeitpunkt. Durch die Nutzung der sekundären Kohlenstoffquelle zur Energieerzeugung ist den noch lebenden *S. aureus* Zellen eine erneute Proliferation („regrowth“) nach 72 Std. Wachstum möglich (Kap. 4.1.3). Die Katabolisierung des Azetats durch den Zitratzyklus und die oxidative Phosphorylierung führen dabei jedoch sowohl zur Erzeugung von Energie in Form von ATP als auch zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dies resultiert neben dem „regrowth“ der Zellen auch in einem energieabhängigen Eintritt der Bakterienzellen in die Sterbephase nach 96 Std. (Kap. 4.1.3) [Chatterjee, 2005; Chatterjee *et al.*, 2005]. Bei Erreichen der Sterbephase sind die Bakterienzellen zunehmenden Stressbedingungen, wie einer Nährstofflimitation, der vermehrten Bildung von ROS sowie der Anreicherung von toxischen Stoffwechselprodukten ausgesetzt [Becerra & Albesa, 2002]. In den späten Wachstumsphasen (ab 48 Std.) fungiert ClpC vermutlich als wichtiges Reparatursystem für CitB, welches durch das vorhandene [4Fe-4S] Cluster sehr anfällig für eine Inaktivierung durch ROS ist und durch diese reversibel inaktiviert werden kann [Gardner & Fridovich, 1992; Kennedy *et al.*, 1987]. Ergänzend dazu aktiviert ClpC unter diesen Bedingungen auch die Expression von *citB* [Chatterjee *et al.*, 2005]. In Übereinstimmung mit letzterer Beobachtung konnte in dieser Arbeit in späten Wachstumsphasen eine Erhöhung der *citB* Transkription (syn. *acnA*) nachgewiesen werden, die sowohl *in vitro* nach 16 Std. als auch innerhalb der endothelialen Zelllinie EA.hy926 nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation beobachtbar war. Bei den *in vitro* Resultaten dieser Arbeit sowie den Untersuchungen von Chatterjee und Kollegen [Chatterjee *et al.*, 2005], war im Wildtyp DSM20231 stets signifikant mehr *citB* Transkript vorhanden. Im Gegensatz dazu war die *citB* Transkription in PBM001 sowohl unmittelbar nach der Invasion in EA.hy926 als auch nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation tendenziell, wenn auch nicht signifikant, erhöht (Kap. 4.7.3). Dies deutet darauf hin, dass ClpC vermutlich speziell innerhalb eukaryoter Zellen weniger an der Transkriptionsregulation von CitB involviert ist. In Einklang mit den

Beobachtungen von Chatterjee *et al.* [2005] konnte in der vorliegenden Arbeit unter den entsprechenden *in vitro* Kultivierungsbedingungen in der *clpC*-Mutante PBM001 in den ersten 96 Std. so gut wie keine Aconitaseaktivität nachgewiesen werden (Kap. 4.1.2). Da die über den Zitratzyklus erzeugte Energie jedoch auch essentiell für den Eintritt in die Sterbephase ist und zudem weniger ROS generiert werden, konnte ein deutlich verbessertes Langzeitüberleben der *S. aureus* Zellen ohne ClpC bis hin zu den späten Wachstumszeitpunkten (168 Std.) beobachtet werden (Kap. 4.1.3) [Chatterjee *et al.*, 2005]. Ein funktionelles ClpC im Wildtyp hingegen gewährleistete eine vollständige Nutzung des Azetats durch den Zitratzyklus und die Fähigkeit eines erneuten Wachstums in den späten Wachstumsphasen (48-72 Std.). Beim Wachstum in dem geschlossenen System der Kulturflasche mit einer definierten Menge an Kohlenstoffquellen führen das effizientere Aufbrauchen des Azetats und der oxidative Stress jedoch schließlich zu einem vermehrten bakteriellen Zelltod in den sich an den „regrowth“ anschließenden Wachstumsphasen (72-168 Std.) (Kap. 4.1.3) [Chatterjee *et al.*, 2005; Chatterjee *et al.*, 2009a].

In der vorliegenden Arbeit wurde vermutet, dass das von Chatterjee *et al.* [2005] sowie eigens beobachtete Phänomen eines deutlich erhöhten *in vitro* Langzeitüberlebens von PBM001 im Vergleich zum Wildtyp möglicherweise nicht nur auf das Fehlen von ClpC zurückzuführen ist, sondern zusätzlich durch die deutlich erhöhte Menge an ClpB (Kap. 4.1.1, 4.7.3) [Chatterjee *et al.*, 2009b; Frees *et al.*, 2004) beeinflusst werden könnte. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde neben einer CitB-Aktivitätsbestimmung (Kap. 4.1.2) auch das Langzeitwachstum und -überleben einer *clpB*-Mutante untersucht (Kap. 4.1.3). Die im Vergleich zum Wildtyp DSM20231 um einen Faktor von ca. 2 verringerte und zur *clpC*-Mutante um ein 5-faches erhöhte CitB-Aktivität der *clpB*-Mutante stimmt mit dem beobachteten schwächeren aber dennoch vorhandenen „regrowth“ von DSM20231 *clpB* nach 72 Std. überein. Hier ist zu erwarten, dass die geringere CitB- und Zitratzyklusaktivität der *clpB*-Mutante weniger Energie für die erneute Zellteilung zur Verfügung stellen kann. In Einklang mit dieser Hypothese zeigte sich in der Sterbephase ein im Vergleich zum Wildtyp geringfügig verbessertes Überleben der *clpB*-Mutante, da höchst wahrscheinlich nicht nur weniger Energie für eine erneute Zellteilung sondern auch für den Eintritt in die Sterbephase verfügbar war. Bei den beschriebenen Unterschieden in der CitB-Aktivität und der Lebendkeimzahlbestimmung zwischen DSM20231 und der isogenen *clpB*-Mutante handelte

es sich jedoch um keine statistisch signifikanten Effekte. Dennoch weisen sie durch den signifikant geringeren „regrowth“ nach 72 Std. Kultivierung und unter Beachtung des revertierten Phänotyps der *clpB*-Komplementante auf eine gewisse Funktion von ClpB in der Regulation der CitB-Aktivität und des *in vitro* Langzeitüberlebens des *S. aureus* DSM20231 Isolats hin. Auch die gemeinsame Regulation von ClpB und ClpC über den negativen Hitze-Schock Regulator CtsR deutet auf ein mögliches Zusammenspiel beider HSP100/ClpATPasen in der Regulation des Langzeitüberlebens von *S. aureus* hin.

Das verbesserte *in vitro* Langzeitüberleben von *S. aureus* mit nicht funktionellem *clpC* wurde bisher nur in den Isolaten DSM20231 und SH1000 nachgewiesen, wobei ein „regrowth“ der Bakterienzellen in der post-stationären Wachstumsphase (48-72 Std.) nur für DSM20231 beobachtet wurde [Chatterjee, 2005]. Um der genetischen Heterogenität innerhalb der Spezies *S. aureus* Rechnung zu tragen, wurde in der hier vorliegenden Arbeit das Langzeitüberleben in weiteren, genetisch nicht nahe miteinander verwandten *S. aureus* Isolaten, wie den Stämmen Newman T.F. und LS1, untersucht. Der für das Isolat DSM20231, nicht aber für SH1000 beobachtete „regrowth“ in der post-stationären Wachstumsphase (Kap. 4.1.3) konnte jedoch auch bei diesen beiden Wildtyp Stämmen nicht beobachtet werden (Kap. 4.4.1). Analog dazu zeigten auch die entsprechenden *clpC*-Mutanten dieser beiden Isolate kein signifikant verbessertes Überleben nach 168 Std. Kultur. Somit führte die *clpC*-Inaktivierung in den getesteten *S. aureus* Isolaten einzig beim Stamm DSM20231 zu einem deutlich erhöhten *in vitro* Langzeitüberleben. Dies lässt darauf schließen, dass der Einfluss der HSP100/Clp ATPase ClpC auf das *in vitro* Langzeitüberleben von *S. aureus* erheblich von dem genetischen Repertoire des jeweiligen Isolates mitbestimmt wird. Da die zuvor schon erwähnten Transkriptionsanalysen (Kap. 4.7.3) auf einen möglichen Defekt im *agr* Zwei-Komponenten-System von DSM20231 hinweisen, könnte dieser genetische Unterschied zwischen DSM20231 und den Isolaten SH1000, LS1 und Newman T.F., die alle ein funktionelles *agr*-System besitzen, möglicherweise für das Langzeitüberleben von Bedeutung sein und eine Erklärung für den in DSM20231 beobachteten Effekt der *clpC*-Mutation auf das *in vitro* Langzeitüberleben liefern. Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Dissertation jedoch leider nicht mehr experimentell untersucht werden.

Während *S. aureus* für lange Zeit als rein extrazellulär lebender Mikroorganismus angesehen wurde, geht man heutzutage davon aus, dass das Bakterium in eine Vielzahl unterschiedlicher Wirtszelltypen einzudringen und in diesen zu persistieren vermag [siehe Sinha & Fraunholz, 2012; Garzoni & Kelley, 2009]. Es wird dabei vermutet, dass *S. aureus* sehr lange asymptomatisch in Wirtszellen überdauern kann und dass diese Fähigkeit maßgeblich dazu beiträgt, dass dieses fakultative Pathogen auch Monate oder sogar Jahre nach einer Antibiotikabehandlung Reinfektionen hervorzurufen vermag [Greer & Rosenberg, 1993; Kipp *et al.*, 2003; Proctor *et al.*, 1995; Proctor *et al.*, 1998; von Eiff *et al.*, 1997a]. Bei der hier eingesetzten Mol von 100 handelt es sich um eine vergleichsweise hohe Menge an Bakterienzellen im Verhältnis zu den eukaryoten Zellen (Kap. 4.2). Diese hohe Konzentration an *S. aureus* Zellen kann, je nach verwendetem Isolat und dessen Fähigkeit, den eukaryoten Zelltod zu induzieren, zu einer verstärkten Apoptose des Wirtszellpools führen. So konnten beispielsweise Haslinger-Löffler *et al.* [2005] aufzeigen, dass 100 *S. aureus* Zellen pro eukaryoter Wirtszelle (entspricht einer Mol von 100) in der größten Anzahl apoptotischer eukaryoter Zellen resultierte und eine weitere Erhöhung der Mol zu keiner vermehrten Apoptoserate führte. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der durchgeführten Mol-Bestimmung jedoch keine gravierende Zytotoxizität der *S. aureus* Wildtyp Isolate DSM20231, SH1000, LS1 und Newman T.F. auf die hier verwendeten eukaryoten Zellen identifiziert werden. Zudem resultierte die Mol 100 bei allen Isolaten in der größten Menge an internalisierten Bakterienzellen. Allerdings führte nur beim Isolat DSM20231 die Erhöhung der Mol zu einer klaren Erhöhung der Internalisierung, was mit einer vermehrten Expression von Adhäsionsproteinen, wie beispielsweise den Fibronektin-Bindeproteinen A und B (FnBP A, B) sowie den Fibrinogen-bindenden Proteinen ClfA und B (Clumping factor A, B) [Dziewanowska *et al.*, 1999; Foster & Höök, 1998; Signas *et al.*, 1989; Sinha *et al.*, 1999] zusammenhängen könnte, die durch die schwache Expression von RNAIII in diesem Isolat hervorgerufen werden sollte. Es ist bekannt, dass durch den *agr*-Lokus eine negative Regulation der Expression von Oberflächenadhäsionsproteinen wie dem Protein A (kodiert durch *spa*), den FnBP's und ClfAB sowie eine positive Expressionsregulation von Exoproteinen, wie z.B. dem  $\alpha$ -Toxin (kodiert durch *hla*), erfolgt [Cheung *et al.*, 2004]. RNAIII verringert die Expression von Protein A, indem es durch die Bindung an die *spa* mRNA zum einen die Translation verhindert und zum anderen den *spa* mRNA Abbau über die Endoribonuklease III stimuliert [Huntzinger *et al.*, 2005]. Während das  $\alpha$ -Toxin vermehrt in

der post-exponentiellen Wachstumsphase produziert wird, erfolgt die Synthese von Protein A hauptsächlich in der exponentiellen Wachstumsphase [Recsei *et al.*, 1986; Morfeldt *et al.*, 1988], sodass die Produktion der beiden Virulenzfaktoren ein Hinweis auf den physiologischen Zustand von *S. aureus* liefert. Passend zu diesen Beobachtungen konnte anhand der hier durchgeführten Transkriptionsanalysen (Kap. 4.7.3) gegensätzlich zur *hla* Transkription (diese wird in diesem Kapitel zu einem späteren Zeitpunkt erläutert) im Stammpaar DSM20231/PBM001 in der exponentiellen Wachstumsphase (3 Std.) im Vergleich zur stationären Phase (16 Std.) eine klar erhöhte *spa* Transkription nachgewiesen werden. Direkt im Anschluss an die Internalisierung in EA.hy926-Zellen entsprach die *spa* Transkription in etwa der nach 16 Std. gemessenen und nahm nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation stark ab. Protein A fungiert hauptsächlich als IgG (Immunglobulin G)- und vWF- (von Willebrand-Faktor) Bindeprotein, als Schutzmechanismus vor der Immunabwehr bzw. Phagozytose des Wirts [Hartleib *et al.*, 2000; O'Seaghdha *et al.*, 2006], ist aber auch bei der Adhäsion von *S. aureus* an Endothelzellen involviert (Edwards *et al.*, 2012). Nichts desto trotz kann die Synthese von *spa* als Indikator für die Produktion weiterer Adhäsionsproteine, wie den FnBP's, angesehen werden [Bur *et al.*, 2013; Foster & McDevitt, 1994]. Die erhöhte *spa* und damit vermutlich auch erhöhte Transkription weiterer für die Invasion wichtiger Adhäsionsproteine (FnBPAB) ist zusätzlich ein Hinweis darauf, dass der angenommene *agr*-Defizit von DSM20231 wahrscheinlich zu einer erhöhten Expression von Oberflächenadhäsionsproteinen und damit hohen Internalisierungsrate in diesem Isolat führt.

In einer früheren Arbeit zeigte Petra Becker [2002] eine reduzierte Invasivität der DSM20231 *clpC*-Mutante in MAC-T-Zellen auf, die jedoch in den eigenen Experimenten mit EA.hy926- und HaCaT-Zellen nicht festgestellt werden konnte (Kap. 4.3.1). Dies mag an den stark zu den eigenen Experimenten abweichenden Invasions- und Lysebedingungen sowie an der verwendeten Epithelzelllinie MAC-T liegen. Dagegen war die Internalisierung von *S. aureus* 8325-4 und der beiden isogenen *clpB*- und *clpC*-Mutanten in MAC-T-Zellen identisch [Frees *et al.*, 2004]. In Einklang mit letzterer Studie konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss der HSP100/Clp ATPasen ClpB und ClpC auf die Internalisierungsfähigkeit von *S. aureus* DSM20231 beobachtet werden. Ebenso führte die Inaktivierung von *clpC* in den Isolaten Newman T.F., LS1 und SH1000 nicht zu signifikanten



Veränderungen in den Internalisierungsfähigkeiten in die endotheliale Zelllinie EA.hy926 und die epitheliale Zelllinie HaCaT, auch wenn hier die *clpC*-Mutante des Isolates SH1000 eine tendenziell geringere Invasivität in EA.hy926-Zellen aufwies, während die *clpC*-Mutante des Isolats Newman T.F. tendenziell besser in HaCaT-Zellen internalisierte (Kap. 4.4.2). Im Gegensatz dazu konnte nach Inaktivierung des Toxin-Antitoxin Systems MazEF von *S. aureus*, welches den bakteriellen Zelltod kontrolliert und von dem bekannt ist, dass es in seiner Aktivität von ClpC beeinflusst wird [Donegan *et al.*, 2010], eine erhöhte Aufnahme der DSM20231 Mutante in beide eukaryote Zelltypen beobachtet werden. Eine zusätzliche *clpC* Inaktivierung führte dabei zu keinem additiven Effekt (Kap. 4.7.2.2). Die Untersuchung eines Effekts des alternativen Sigma-Faktors  $\sigma^B$  im Einzelnen und in Verbindung mit ClpC auf die Invasivität ergab ebenfalls eine signifikant erhöhte Internalisierung von DSM20231 *sigB* (MB290) und DSM20231 *clpC sigB* (MB288) in EA.hy926-Zellen (Kap. 4.7.2.2). Letztere Beobachtungen sind insofern überraschend, da bekannt ist, dass  $\sigma^B$  einen positiven Effekt auf die Expression der FnBP's ausübt (Entenza *et al.*, 2005), die wiederum, vor allem bei EA.hy- aber weniger in HaCaT-Zellen, die Internalisierung der Bakterien in die Wirtszellen fördern [Kintarak *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2008; Peacock *et al.*, 1998]. Aus diesem Grund und aufgrund der relativ großen Standardabweichungen der Experimente zur Internalisierung von MB290 und MB288 in HaCaT-Zellen wären eine nähere Identifizierung des Widerspruchs und der Abweichungen nötig.

Die Internalisierung der Bakterien stellte den Zeitpunkt Null für die darauf folgenden Assays zur intrazellulären Persistenz dar. Da nach 24 Std. intrazellulärer Persistenz bei allen getesteten *S. aureus* Derivaten ähnlich hohe Prozentsätze an kultivierbaren Zellen rückgewonnen werden konnten, darf davon ausgegangen werden, dass etwaige interexperimentelle Beladungsunterschiede der eukaryoten Zellen mit Bakterien zu Beginn des Experiments (Kap. 4.3.1, 4.4.2 und 4.7.2.2) keinen gravierenden Einfluss auf die anschließende Untersuchung der intrazellulären Persistenz ausüben. Aus diesem Grund sind nach 96 bzw. 168 Std. sichtbare Unterschiede nicht auf Beladungsunterschiede der eukaryoten Zelllinien rückführbar. In diesen Zellkulturexperimenten konnte in EA.hy926- und HaCaT-Zellen ein signifikant erhöhtes intrazelluläres Überleben der DSM20231 *clpC*-Mutante PBM001 nach 96 und 168 Std. nachgewiesen werden, während die Überlebensrate der *clpC/clpC*<sup>+</sup>-Komplementante auf Wildtyp Niveau lag (Kap. 4.3.2). Die Inaktivierung von *clpB*

im Stamm DSM20231 hingegen führte zu keiner klaren Veränderung der intrazellulären Überlebensrate nach 96 und 168 Std. Co-Kultur. Diese Befunde lassen vermuten, dass ClpB zumindest in *S. aureus* Isolaten mit intaktem ClpC für die intrazelluläre Persistenzfähigkeit dieses Pathogens von untergeordneter Bedeutung ist. Jedoch kann eine Funktion von ClpB auf das intrazelluläre Langzeitüberleben von *S. aureus* Isolaten mit defektem ClpC nicht ausgeschlossen werden.

Anders als in den *in vitro* Langzeitversuchen zeigte sich in den weiterführenden Zellkulturexperimenten mit den genetisch unterschiedlichen *S. aureus* Isolaten LS1, Newman T.F. und SH1000 eine deutliche Abhängigkeit des intrazellulären Langzeitüberlebens vom Wirtszelltyp und dem jeweiligen *S. aureus* Isolat (Kap. 4.4.3). Während die intrazelluläre Persistenz der isogenen *clpC*-Mutanten aller drei *S. aureus* Isolate sowohl nach 96 Std. als auch von Newman T.F. *clpC* und SH1000 *clpC* nach 168 Std. Co-Kultur in HaCaT-Zellen signifikant erhöht war, wies in der Endothelzelllinie EA.hy926 nur SH1000 *clpC* ein im Vergleich zum Wildtyp signifikant verbessertes intrazelluläres Langzeitüberleben auf. Die beiden anderen *clpC*-Mutanten zeigten in diesem eukaryoten Zelltyp nur eine tendenziell verbesserte Überlebensfähigkeit. Hierbei ist jedoch besonders hervorzuheben, dass HaCaT-Zellen im Vergleich zu den EA.hy926-Zellen bei allen untersuchten *S. aureus* Isolaten eine deutlich erhöhte Abtötungs- bzw. Inaktivierungsfähigkeit aufwiesen. Es wäre denkbar, dass die bei allen bakteriellen Stammpaaren beobachtete höhere Klärungsrate in HaCaT-Zellen einen möglichen Selektionsdruck auf die *S. aureus* Zellen ausübt, durch den das von *S. aureus* Zellen ohne funktionellem ClpC bereits verbesserte Überleben noch deutlicher zum Tragen kommt.

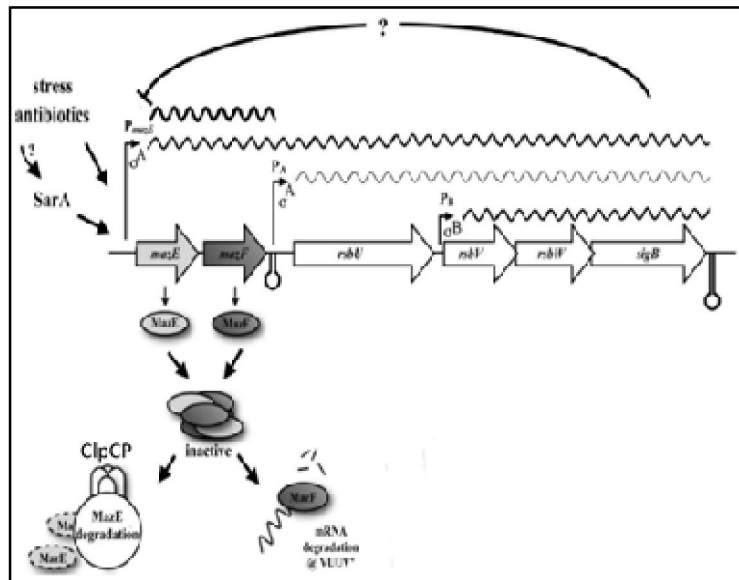
Zusätzlich zur erhöhten intrazellulären Persistenz konnten vom Derivat Newman T.F. *clpC* in einem Maus-Abszessmodell ein signifikant erhöhter Anteil lebender Bakterienzellen 4 Tage nach retro-orbitaler Injektion aus der Leber isoliert werden. Dies lässt darauf schließen, dass ein Fehlen von ClpC für das Überleben von *S. aureus* in diesem Organ von Vorteil ist (Kap. 4.5). Dabei konnte eine wichtige Funktion von ClpC durch eine vollständige Umkehr der *clpC*-Komplementante in den Phänotyp des Wildtyp verdeutlicht werden (Kap. 4.5). Durch die Untersuchung der Rolle von ClpC im Langzeitüberleben weiterer *S. aureus* Stämme konnte außerdem aufgezeigt werden, dass das Langzeitüberleben unter Kulturbedingungen nur

bedingt auf die intrazelluläre Persistenzfähigkeit schließen lässt. Denn obwohl LS1 *clpC* kein und Newman T.F. *clpC* ein nur leicht verbessertes *in vitro* Langzeitüberleben aufwiesen, war die intrazelluläre Überlebensfähigkeit beider Isolate in HaCaT-Zellen deutlich erhöht. Diese Feststellung lässt, zusätzlich zur Steuerung der Zitratzyklusaktivität, weitere Mechanismen vermuten, mit denen ClpC in seiner Funktion als molekulares Chaperon die Überlebensfähigkeit innerhalb eukaryoter Zellen bzw. *in vivo* beeinflusst.

Einer dieser Mechanismen könnte die Stabilisierung von Toxin-Antitoxin (TA) Systemen sein. TA Module haben eine wichtige Funktion in der Stressantwort von *S. aureus* durch die Regulation des programmierten Zelltods und der Stilllegung des Metabolismus unter beispielsweise Nährstoffmangel bzw. während der Persistenz [Donegan & Cheung, 2009; Gerdes *et al.*, 2005; Magnuson, 2007]. Der programmierte Zelltod ist eine allgemeine gültige Bezeichnung für jegliche Form des Zelltods, der durch ein intrazelluläres Programm vermittelt wird [Hengartner, 2000; Jacobson *et al.*, 1997; Raff, 1998]. TA Systeme setzen sich aus einem stabilen Toxin und einem eher labilen Antitoxin zusammen, deren Co-Transkription durch Stress induziert wird [Gerdes *et al.*, 2005]. Der Abbau des Antitoxins resultiert in der Toxin-Aktivierung, das daraufhin z.B. spezifisch mit einer mRNA interferieren bzw. diese abbauen kann und somit den bakteriellen Zelltod einleitet. In *S. aureus* konnten bisher fünf solcher TA Systeme, Axe1-Txe1 und Axe2-Txe2, MazEF, RelBE und YefM-YoeB identifiziert werden [Cherny & Gazit, 2004; Donegan & Cheung, 2009; Pandey & Gerdes, 2005; Yoshizumi *et al.*, 2009]. Es konnte dabei gezeigt werden, dass ClpC im Zusammenspiel mit der proteolytisch aktiven Clp-Protease ClpP das einzige in *S. aureus* vorhandene ATPase Chaperon mit einer Beteiligung am Abbau der Antitoxine MazE, Axe1 und Axe2 ist. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde von Donegan *et al.* [2010] schon die Vermutung geäußert, dass das verbesserte *in vitro* Überleben einer *clpC*-Mutante zum Teil mit einer verstärkten Inaktivierung von Toxinen durch die fehlende Antitoxin Proteolyse zusammenhängen könnte.

Um diese Hypothese zu testen wurde in dieser Arbeit zusätzlich zu ClpC der Einfluss von MazEF und  $\sigma^B$  auf das *in vitro* Langzeitüberleben sowie die intrazelluläre Persistenz von *S. aureus* betrachtet (Kap. 4.7.2). Die Gene *mazE* und *mazF* bilden zusammen mit den Regulatoren des alternativen Transkriptionsfaktors  $\sigma^B$ , RsbU, RsbV und RsbW in *S. aureus* ein

gemeinsames Operon [Gertz *et al.*, 1999; Kullik *et al.*, 1998; Senn *et al.*, 2005b] und werden mit diesen unter Stressbedingungen, Wachstumsphase-abhängigen Signalen (stationäre Wachstumsphase) und ATP-limitierenden Bedingungen [Chatterjee *et al.*, 2005; Kullik *et al.*, 1998] co-transkribiert [Donegan & Cheung, 2009; Senn *et al.*, 2005b] (Abb. 6.1).



**Abb. 6.1: Schematisches Modell für die *mazEF* Regulation in *S. aureus*.** Die von  $P_{mazEF}$  initiierte Transkription zusammen mit einem schwachen *rho*-unabhängigen Terminator downstream von *mazF* bildet sowohl das 0,7 knt *mazEF* Transkript als auch ein 3,7 knt *mazEF-rsbUVW-sigB* Transkript. Letzteres wird für eine vollständige  $\sigma^B$ -Aktivität benötigt und wirkt bei einer schwachen  $P_A$  Promotoraktivität maßgeblich an *rsbU*-abhängigen Transkripten mit. Die Transkription von  $P_{mazE}$  wird durch Umgebungssignale und Antibiotikastress induziert und möglicherweise durch eine direkte Bindung von SarA an die -35-Promotorseite vermittelt. Außerdem wird die Transkription der 0,7 und 3,7 knt mRNA's, vermutlich durch ein Intermediat, negativ durch  $\sigma^B$  reguliert. Es besteht die Möglichkeit, dass dies einen negativen-feedback Loop bildet, worin  $\sigma^B P_{mazE}$  reprimiert. Die Produkte aus der Translation von *mazEF* bilden ein Antitoxin MazE, dass in einer höheren Stöchiometrie das Toxin MazF bindet und inaktiviert. Nach einem proteolytischen Abbau von MazE durch ATP-abhängige Proteasen, wahrscheinlich u.a. ClpCP, degradiert MazF von *S. aureus* spezifisch empfindliche mRNA an der VUUV-Sequenz [modifiziert nach: Donegan & Cheung, 2009; Fu *et al.*, 2007].

In der *clpC*-Mutante sollte durch den fehlenden Antitoxin Abbau, ebenso wie in der  $\Delta mazEF$ -Mutante (DSM136), weniger Toxin vorhanden und somit die Überlebensfähigkeit erhöht sein. Im Langzeitwachstum war erkennbar, dass der „regrowth“ Effekt von ClpC nicht über MazEF beeinflusst wird, da eine erneute post-stationäre Replikation der Bakterienzellen sowohl bei DSM20231 und der  $\Delta mazEF$ -Mutante, aber nicht bei der *clpC*-Mutante und *clpC*  $\Delta mazEF$ -Doppelmutante (DSM136 *clpC*), erkennbar war. Bezogen auf das *in vitro*

Langzeitüberleben und das Überleben innerhalb eukaryoter Zellen war jedoch entgegen den Erwartungen kein einheitlicher Einfluss des MazEF TA Systems erkennbar. In EA.hy926-Zellen konnte, in Einklang mit der von Donegan *et al.* [2010] geäußerten Hypothese und ungeachtet der *in vitro* Resultate, ein signifikant erhöhtes Langzeitüberleben nach  $\Delta mazEF$  Inaktivierung beobachtet werden, auch wenn dieser Anstieg geringer als bei den entsprechenden *clpC*- und *clpC*  $\Delta mazEF$ -Mutanten ausfiel. In HaCaT-Zellen konnte dieser Befund jedoch nicht reproduziert werden. Hier entsprach das Überleben der  $\Delta mazEF$ -Mutante *in vitro* und im Zellkulturmodell stets dem des Wildtyp bzw. war in späten Wachstumsphasen und der intrazellulären Persistenz nach 168 Std. eher verschlechtert, während eine zusätzliche Inaktivierung von *clpC* in dieser Mutante wiederum zu einer erhöhten Überlebensrate führte. Eine mögliche Ursache für diese unerwarteten Effekte von MazEF auf die Persistenz von *S. aureus* könnte sein, dass im ClpCP proteolytischen Komplex ClpP zwar essentiell für den Abbau von MazE, Axe1 und Axe2 ist, ClpC hingegen in der Degradierung aller drei Antitoxine involviert, aber nur für den Abbau der letzten beiden hauptverantwortlich ist [Donegan *et al.*, 2010]. Daher wurde schon von Donegan und Kollegen [2010] die Hypothese aufgestellt, dass ein weiteres Chaperon teilweise den Abbau von MazE durch ClpC vervollständigt, eine andere ATP-abhängige Protease den Abbau von MazE prozessiert oder ClpP auch ohne ClpC zu einer MazE Degradierung führen könnte. Da ClpC besonders für den Abbau der Antitoxine Axe1 und 2 von Bedeutung ist, besteht zudem die Möglichkeit, dass die in *clpC*-Mutanten zu beobachtende erhöhte intrazelluläre Überlebensrate über die Inaktivierung der entsprechenden Toxine Txe1 und Txe2 hervorgerufen werden könnte. Es war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich diese Hypothese zu untersuchen.

Die *sigB*-Mutation hatte, wie bereits von I. Chatterjee [2005] beobachtet, *in vitro* keinen markanten Einfluss auf das Langzeitüberleben (Kap. 4.7.2). Dabei ist zu erwähnen, dass die CitB-Aktivität, wenngleich auch nicht der post-stationäre „regrowth“, zum Teil  $\sigma^B$ -abhängig ist [Chatterjee, 2005; Somerville *et al.*, 2003]. Im Zellkulturmodell konnte, wie zuvor schon für die  $\Delta mazEF$ -Mutante, in EA.hy926-Zellen, nicht aber in HaCaT-Zellen, ein erhöhtes Überleben der *sigB*-Mutante (MB290) nach 168 Std. beobachtet werden. Trotz dieser Gegensätze wurde das Überleben der *sigB*-Mutante sowohl *in vitro* als auch im

Zellkulturmodell in beiden eukaryoten Zelllinien stets durch eine zusätzliche *clpC*-Mutation bei DSM20231 *clpC sigB* (MB288) angehoben.

Ein markanter Einfluss bzw. eine entscheidende Rolle in der Regulation des *in vitro* Langzeitüberlebens sowie des Überlebens innerhalb eukaryoter Zellen konnte mithilfe der hier durchgeführten Versuche damit weder für *mazEF* noch für *sigB* identifiziert werden. Der Einfluss von *mazEF* und *sigB* auf das Überleben von *S. aureus* DSM20231 scheint dabei von den experimentellen Konditionen, d.h. *in vitro* oder Zellkultur-Bedingungen und bei letzteren vom Wirtszelltyp, abhängig zu sein. Weder eine *mazEF*- noch eine *sigB*-Einzelmutation resultierte in einem einheitlichen Phänotyp in den *in vitro* und Zellkulturexperimenten und führte nach 168 Std. Co-Kultivierung einzig in der Endothelzelllinie EA.hy926 zu einem erhöhten Überleben im Vergleich zum Wildtyp DSM20231. Der Einfluss von  $\sigma^B$  auf die Produktion von Virulenzfaktoren ist weitestgehend antagonistisch zum Effekt von RNAIII [Bischoff *et al.*, 2004; Cheung *et al.*, 2002; Novick, 2002].  $\sigma^B$  hat dementsprechend einen negativen Effekt auf die Expression von Exoproteinen und Toxinen, wie dem  $\alpha$ -Hämolysin Hla, der Serin-Protease SspA und der thermostabilen Nuclease Nuc [Bischoff *et al.*, 2004]. Von *S. aureus* Small Colony Variants (SCV's) ist bekannt, dass sie eine konstitutiv hohe  $\sigma^B$  Expression sowie geringe Aktivität des *agr*-Systems aufweisen, wodurch ein erhöhtes intrazelluläre Überleben von SCV's begünstigt wird [Mitchell *et al.*, 2013; Moisan *et al.*, 2006; Senn *et al.*, 2005a; Sendi & Proctor, 2009]. Bei der in dieser Arbeit verwendeten DSM20231 *sigB*-Mutante (MB290) wäre daher aufgrund der nicht vorhandenen  $\sigma^B$  Expression eine vermehrte Produktion an Exoproteinen zu erwarten gewesen. Allerdings ist dabei zu beachten, dass der angenommene *agr*-Defekt von DSM20231 eher in einer verringerten Expression von Exoproteinen resultiert, was eine Vermutung über die Produktion von Exoproteinen und Toxinen in MB290 erschwert.

Als weitere Ursache für das beobachtete erhöhte Langzeitüberleben von PBM001, speziell innerhalb eukaryoter Zellen, wurde eine Auswirkung der *clpC* Inaktivierung auf die Apoptose (den programmierten Zelltod) der eukaryoten Wirtszellen vermutet. Die Hypothese für die Untersuchung der Apoptose war, dass durch eine Inaktivierung von *clpC* in *S. aureus* möglicherweise die Expression von Virulenzfaktoren, wie dem Poren-formenden  $\alpha$ -Hämolysin ( $\alpha$ -Toxin), negativ beeinflusst wird. Bereits Somerville *et al.* [2002; 2003] beschrieben bei einer *citB*-Mutante eine verringerte Expression an Virulenzfaktoren und

dementsprechend diskutierten Chatterjee *et al.* [2005], ähnlich zu einer *citB*-Mutante, nicht nur einen verringerten Azetatmetabolismus, sondern ebenfalls eine mögliche reduzierte Synthese von Virulenzfaktoren in Zellen der *clpC*-Mutante. Außerdem beschrieben zahlreiche Autoren die Fähigkeit von *S. aureus*, nach der Invasion in verschiedenste eukaryote Zelltypen, wie Epithel-, Endothelzellen, Keratinozyten, Osteoblasten und Lymphozyten, den programmierten Zelltodinduzieren zu können [Bayles *et al.*, 1998; Jonas *et al.*, 1994; Kahl *et al.*, 2000; Menzies & Kourteva, 1998; Nuzzo *et al.*, 2000; Tucker *et al.*, 2000]. Dabei ist ein wichtiger Mechanismus für die Induktion der Apoptose u.a. die Expression des Poren-formenden  $\alpha$ -Toxins [Bantel *et al.*, 2001; Haslinger *et al.*, 2003; Menzies & Kourteva, 1998]. *S. aureus* Zellen befinden sich direkt nach der Invasion in eukaryote Wirtszellen in Endo- bzw. Phagosomen. Diese fusionieren normalerweise bereits nach wenigen Stunden mit Lysosomen, deren Inhalt aus reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies sowie Proteasen toxisch auf die Pathogene wirkt [Schröder *et al.*, 2006]. *S. aureus* Zellen können jedoch vor der Verschmelzung zum Phago-Lysosom durch die Expression von Toxinen aus diesem entweichen, im Zytoplasma des Wirts replizieren und durch die Einleitung der Apoptose der Wirtszelle zur Freilassung der Bakterienzellen führen [Bayles *et al.*, 1998]. Ebenso ist bekannt, dass persistierende *S. aureus* Zellen diese Verschmelzung verhindern oder in dem angesäuerten Milieu der Lysosomen überdauern können und zudem durch Herunterregulierung von Virulenzfaktoren eine intrazelluläre Persistenz begünstigen [Bayles *et al.*, 1998; Schröder *et al.*, 2006; Sinha & Fraunholz, 2012; Tuscherr *et al.*, 2010]. Ein Nachteil des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Persistenzassays ist, dass die mit *S. aureus* infizierten eukaryoten Zellen in Anwesenheit von nicht zellgängigen Antibiotika inkubiert wurden, um zu verhindern, dass aus den eukaryoten Zellen freigesetzte Bakterien eine erneute Infektion der Wirtszellen hervorrufen könnten. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die im Vergleich zur *clpC*-Mutante geringere Anzahl an rückgewonnenen Bakterienzellen der *clpB*-Mutante und des Wildtyps nach 96 und 168 Std. aus EA.hy926 und HaCaT auf eine höhere Apoptoserate der Wirtszellen zurückzuführen ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden sowohl die Apoptoseraten der Wirtszellen als auch die  $\alpha$ -Toxin Aktivität der Bakterienzellen bestimmt.

Die in Kapitel 4.7.1 nach 24 Std. durchgeführten Assays zur Apoptose von EA.hy926- und HaCaT-Zellen weisen jedoch auf keine markante Beeinflussung der eukaryoten Zellen durch die intrazellulär lokalisierten Bakterienzellen von DSM20231 und der beiden *clp*-Mutanten

hin. Ebenso ergab der Test auf die  $\alpha$ -Hämolysin Aktivität auf Agarplatten mit Kaninchenblut (Kap. 4.7.1.1) keinen klaren Unterschied zwischen Wildtyp, *clpB*- und *clpC*-Mutante. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass es für die Apoptose eines hoch-invasiven und hämolytischen Phänotyps bedarf und nicht alle *S. aureus* Stämme zur Induktion der Apoptose eukaryoter Zellen fähig sind. Zudem hängt die Induktion der Apoptose nur zum Teil von der Aktivität des  $\alpha$ -Toxins ab und wird zusätzlich von weiteren Agr-, Sae-, SarA- und  $\sigma^B$ -regulierten Faktoren, wie etwa den  $\beta$ - und  $\delta$ -Toxinen, beeinflusst [Fraunholz & Sinha, 2012; Giese *et al.*, 2011; Haslinger-Löffler *et al.*, 2005; Kuroda *et al.*, 2007; Wesson *et al.*, 1998], die möglicherweise in DSM20231 nicht bzw. in keiner ausreichende Menge produziert werden um zur Apoptose der Wirtszellen zu führen.

Mittels der *in vitro* sowie mit intrazellulär lokalisierten Bakterienzellen durchgeführten Transkriptionsanalysen (Kap. 4.7.3) konnte diese Annahme bekräftigt werden. Die *RNAIII* Transkription, des Effektors für die *agr*-spezifische Genregulation betrug im Isolat DSM20231 nahezu Null. Damit übereinstimmend konnte ebenfalls nur eine geringe *hla* Transkription, dessen Expression positiv durch den *agr*-Lokus beeinflusst wird, aufgezeigt werden. Denkbar wäre, dass DSM20231 Wildtyp-Zellen nach der Internalisierung und der damit verbundenen Phagozytose ausreichend  $\alpha$ -Toxin produzieren, um aus dem Phagosom auszutreten bevor eine Lysosom-Fusion stattfinden kann. Die Menge an Toxin reicht jedoch möglicherweise nicht aus, um eine Apoptose der Wirtszelle zu induzieren.

Trotz der *in vitro* und innerhalb von EA.hy926-Zellen stets geringen *RNAIII* Transkription (Kap. 4.7.3) war in Einklang mit den Beobachtungen von Novick [2003] mit zunehmender Inkubationszeit beim Wildtyp *in vitro* in der post-exponentiellen Phase (16 Std.) und vom Zeitpunkt direkt nach der Internalisierung bis zu 96 Std. intrazellulärer Persistenz eine Erhöhung der *RNAIII* mRNA Transkription sowohl in DSM20231 als auch in PBM001 erkennbar. Tuschcherr *et al.* [2011] beschrieben in Zellkulturexperimenten mit der Epithelzelllinie A549 in den ersten 7 Tagen nach Infektion eine initiale Erhöhung der *agr* Expression, die in den folgenden 14 Tagen jedoch wieder abnahm. Die erhöhte *agr* Expression nach Invasion in die Wirtszelle wird von *S. aureus* für eine Verhinderung der Heranreifung von Phagosomen und damit dem bakteriellen Abbau benötigt. Im Verlauf des späteren Infektionsprozesses verhindert eine Herunterregulierung von *agr* die Abtötung der Bakterien durch die Wirtszelle [Haslinger-Löffler *et al.*, 2006; Schnaith *et al.*, 2007;



Tuchscherr *et al.*, 2011]. Die nach 96 Std. intrazellulärer Persistenz deutlich verringerte *RNAIII* und *hla* Transkription der *clpC*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp entspricht zudem den Beschreibungen von intrazellulär persistierenden *S. aureus*, anhand derer ein Überleben im Wirt ermöglicht wird ohne eine Immunantwort auszulösen [Kahl *et al.*, 2005; Tuchscherr *et al.*, 2011]. Ähnlich zur Transkription des *agr*-Lokus verhielt sich die *hla* mRNA Transkription *in vitro* und innerhalb von EA.hy926-Zellen. Die *hla* Transkription war in der post-exponentiellen bzw. stationären Wachstumsphase (16 Std.) sowie nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation [Morfeldt *et al.* 1988; Recsei *et al.* [1986] in DSM20231/PBM001 erhöht.

Das DNA-Bindeprotein SarA fördert indirekt über die P2- und P3-Promotoren des *agr*-Lokus die *RNAIII* Expression, moduliert aber auch direkt die Expression von Virulenzfaktoren, wie z.B. Proteasen [Bronner *et al.*, 2004; Cheung & Projan, 1994; Heinrichs *et al.*, 1996]. Für SarA kodieren insgesamt drei sich überlappende Transkripte *sarA*, *sarB* und *sarC*. Die Transkripte *sarA* und *sarB* werden primär über den „housekeeping“ Sigma-Faktor  $\sigma^A$  kontrolliert und unter *in vitro* Bedingungen in der exponentiellen Wachstumsphase maximal produziert. Die *sarC* Transkription findet primär in der spät-exponentiellen und stationären Wachstumsphasen statt und ist vom alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^B$  abhängig [Bayer *et al.*, 1996; Deora *et al.*, 1997; Manna *et al.*, 1998]. Weitestgehend passend zur *asp23* und *RNAIII* Transkription stieg die *sarA* mRNA Transkription mit zunehmender *in vitro* Kultivierungs- und Co-Inkubationszeit in EA.hy926-Zellen an. *asp23* ist ein Markergen für die Aktivität des alternativen Sigma-Faktors  $\sigma^B$  [Gertz *et al.*, 1999; Kullik & Giachino, 1997]. Außerdem war, ebenfalls wie bei der *RNAIII* Produktion zu beobachten, auch die *sarA* Transkription *in vitro* nach 16 Std. und in 96 Std. intrazellulär persistierenden Zellen der *clpC*-Mutante stark verringert.

Des Weiteren stehen intrazellulär persistierende SCV's u.a. in Verbindung mit Veränderungen in der Virulenz-Regulator und –Genexpression, die ein erhöhtes Überleben innerhalb der Wirtszelle fördern. Sie besitzen, wie auch in dieser Arbeit für die Transkription von *sarA*, *RNAIII* und *hla* in PBM001 beschrieben, eine verringerte Aktivität der globalen Regulatoren SarA und RNAIII und somit eine verminderte Toxinproduktion ( $\alpha$ -Toxin), aber erhöhte Expression von Zellwandproteinen (Protein A, FnBP's). Mit der verbesserten Bindung an die Wirtszellen wird die Invasion erleichtert, wobei die geringere

Toxinproduktion ein „stilles“ bzw. vom Immunsystem unerkanntes Überleben innerhalb der eukaryoten Zelle begünstigt [Kahl *et al.*, 2005; Tuchscherer *et al.*, 2010; Vaudaux *et al.*, 2002]. SCV's können beispielsweise bei vielen verschiedenen persistierenden Infektionen isoliert werden, wie sie beispielsweise in der Lunge von Patienten, die an einer zystischen Fibrose erkrankt sind, vorliegen [Mitchell *et al.*, 2013; Moisan *et al.*, 2006; Proctor *et al.*, 2006]. SCV's haben vielfach einen Defekt in der Elektronentransportkette. Eine Beeinträchtigung der Elektronentransportkette führt zu einer Reduktion des elektrochemischen Gradienten, wodurch wiederum weniger ATP produziert wird. Somit lässt sich das verlangsamte Wachstum und die deutlich kleinere Koloniegröße von SCV's erklären. Es ist ebenfalls bekannt, dass Bakterienzellen für den Eintritt in die Absterbephase Energie benötigen [Chatterjee, 2005]. Eine Gemeinsamkeit von SCV's und der *clpC*-Mutante ist eine verringerte Energieverfügbarkeit, die allerdings bei SCV's durch eine Beeinträchtigung in der Elektronentransportkette und daraus resultierende geringere Menge an Energie in Form von ATP verursacht wird. Hingegen liegt bei der *clpC*-Mutante ein geringeres Energielevel in späten Wachstumsphasen in einer verringerten Zitratzyklusaktivität und dadurch fehlenden Metabolisierung von Azetat begründet. Zudem haben SCV's eine geringere Suszeptibilität gegenüber einigen Antibiotika. Das deutlich langsamere Wachstum hindert die Wirkung der Zellwand-aktiven  $\beta$ -Lactame und das Fehlen eines elektrochemischen Gradienten verhindert die Wirkungsweise von positiv geladenen Aminoglykosiden [Proctor *et al.*, 1995; Proctor *et al.*, 1998]. Chatterjee *et al.* [2006] konnten bei einem klinischen SCV Isolat eine fehlende Expression der HSP100/Clp ATPase ClpC und der Aconitase aufzeigen. Außerdem können Vertreter der Gattungen *Coxiella*, *Salmonella*, *Mycobacterium* und *Legionella* aber auch SCV's die Fusion des Phagosoms mit einem Lysosom verhindern oder auch die Reifung des Phagosoms und die Ansäuerung verändern, bzw. in dem angesäuerten Milieu der Phago-Lysosome überdauern [Finlay & Falkow, 1997; Fraunholz & Sinha, 2012; Ogawa *et al.*, 2011; Schröder *et al.*, 2006; Sinha & Fraunholz, 2012; Tuchscherer *et al.*, 2010].

Vermutlich schützt die dicke Zellwand [Bulger & Bulger, 1967] und die Hochregulierung von  $\sigma^B$  [Moisan *et al.*, 2006] SCV's vor Stressfaktoren und einer Abtötung durch den Inhalt der Lysosome. Bekannterweise ist  $\sigma^B$  in *S. aureus* verstärkt in späten Wachstumsphasen aktiv [Bischoff *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2005] und außerdem führt die Inaktivierung von *clpC* in dieser Spezies zu einer Erhöhung der  $\sigma^B$ -Aktivität und damit zu einer gesteigerten

Expression von *asp23* [Chatterjee *et al.*, 2009b]. Damit übereinstimmend zeigte sich auch in den eigenen *in vitro* Ergebnissen (Kap. 4.7.3) eine deutliche Steigerung der *asp23* Transkription von 3 auf 16 Std. Inkubationszeit bei DSM20231/PBM001 und außerdem zu beiden Messzeitpunkten eine erhöhte *asp23* Produktion in Zellen der *clpC*-Mutante. Nach der Internalisierung in EA.hy926-Zellen und 96 Std. später war die *asp23* Transkription im Wildtyp und der *clpC*-Mutante vergleichsweise zu den *in vitro* Daten geringer, stieg in Wildtypzellen nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation jedoch klar an, während bei PBM001 Zellen kein Anstieg erkennbar war. Dass die *asp23* Transkription nach 96 Std. intrazellulärer Persistenz in Zellen der *clpC*-Mutante klar unter der des Wildtyps lag, könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Wildtyp zu diesem Zeitpunkt verstärkt ungünstigen Bedingungen ausgesetzt ist. Die von Moisan und Kollegen [2006] diskutierte Erhöhung von  $\sigma^B$ , mit der SCV's innerhalb von Wirtszellen vor einer Abtötung durch den Inhalt der Lysosome geschützt sind, konnte in den eigenen Experimenten mit Zellen der *clpC*-Mutante nach der Internalisierung und nach 96 Std. intrazellulärem Überleben in EA.hy926-Zellen jedoch nicht beobachtet werden. Vielmehr weisen sie erneut darauf hin, dass  $\sigma^B$  für den *clpC* Phänotyp auf die Persistenz von untergeordneter Bedeutung ist. Da Chatterjee *et al.* [2009a] in späten Wachstumsphasen in der *clpC*-Mutante einen im Vergleich zu DSM20231 erhöhten Gehalt an unverzweigten Fettsäuren beobachten konnte, der zu einer widerstandsfähigeren Plasmamembran führen sollte, die wiederum ein besseres Überleben in Phago-Lysosomen hervorrufen könnte, darf spekuliert werden, dass der *clpC* Effekt auf die Persistenz zumindest zum Teil über diesen Mechanismus hervorgerufen wird.

Neben der Invasion in die Wirtszelle und der Formation von SCV's ist die Biofilmbildung ein weiterer Mechanismus von *S. aureus*, um für längere Zeitperioden im Wirt persistieren zu können [Costeron *et al.*, 1999; Fowler *et al.*, 2000; Proctor *et al.*, 1995]. Aus diesem Grund wurde neben dem Einfluss von ClpB und ClpC auf die Internalisierung und intrazelluläre Persistenz auch die Rolle beider HSP100/Clp ATPasen in der Biofilmbildung dieses Bakteriums untersucht. *S. aureus* ist es möglich, einen Biofilm sowohl auf inerten als auch auf lebenden Oberflächen zu bilden [Herrmann & Peters, 1997; Reid, 1999]. Die Formation eines ausgereiften Biofilms erfolgt dabei in aufeinanderfolgenden Schritten. Zunächst adhären einzelne Bakterienzellen an eine Oberfläche. Vermutlich wird diese initiale Adhärenz größtenteils durch bakterielle Oberflächenproteine bestimmt [Hogt *et al.*, 1986;

Pascual *et al.*, 1986]. MSCRAMM's (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) sind an der Bakterienoberfläche lokalisierte Adhäsine, wie z.B. die FnBP A und B, Protein A, das Kollagen-Bindeprotein Cna und ClfA [Chavakis *et al.*, 2007]. Mit diesen ist eine spezifische Bindung an Wirtsfaktoren, wie z.B. Fibronektin, Fibrinogen, Kollagen und den von Willebrand-Faktor möglich [Herrmann *et al.*, 1988; von Eiff *et al.*, 1999]. Der primären Adhäsion an eine Oberfläche folgt die Akkumulationsphase, d.h. die Bindung weiterer Bakterienzellen an bereits an eine Oberfläche adhäsionierte Bakterienzellen. An dieser Zell-Zell-Interaktion ist das „Polysaccharid Interzellulär Adhäsine“ (PIA) maßgeblich beteiligt. PIA ist ein positiv geladenes, lineares  $\beta$ -1,6-verknüpftes Glukosaminglykan aus N-Acetylglukosaminresten und enthält ca. 15 % de-N-acetylierte Aminogruppen und ist mit Succinat- und Phosphatresten substituiert [Mack *et al.*, 1996]. Die für die PIA-Expression benötigten Gene liegen auf dem *ica* („intercellular adhesion“)-Operon kodiert [Heilmann *et al.*, 1996]. Das Operon setzt sich aus den Genen *icaA*, *D*, *B*, *C* und *R* zusammen [Cramton *et al.*, 1999; Gerke *et al.*, 1998; Heilmann *et al.*, 1996]. Die Regulation des Operons unterliegt den zwei DNA-Bindeproteinen IcaR und SarA [Beenken *et al.*, 2003; Conlon *et al.*, 2002], dem alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^B$  und wird zudem über die Zitratzyklusaktivität beeinflusst [Majerczyk *et al.*, 2008; Vuong *et al.*, 2005]. Neben diesem *ica*-abhängigen Biofilm existieren alternative Wege der Biofilmbildung. Bei einem weiteren Adhäsionsprotein für die Biofilmbildung handelt es sich um ein an die Zellwand von *S. aureus* gebundenes, so genanntes Bap (Biofilm associated protein) Protein. Dieses ist in erster Linie in der Adhäsion an Polystyrene Oberflächen, der interzellulären Adhäsion und damit in der Biofilmbildung involviert [Cucarella *et al.*, 2001; Otto, 2008]. Zudem besitzt *S. aureus* in der Zellwand verankerte Teichonsäuren (Teichoic Acids, TA) und TA's, die mit einem Lipid-Anker in der Plasmamembran verlinkt vorliegen. TA's bestehen aus (1,3)-verlinktem poly (glycerol/ribitol phosphate), substituiert mit Glucose, N-Acetylglucosamine, D-Alanine oder 6-Alanyl Glucose und erhöhen v.a. die Bindung an mit Fibronektin gecoatete Oberflächen [Hussain *et al.*, 1992; Hussain *et al.*, 1993; Otto, 2008]. Des Weiteren existiert der Citrat-abhängige Biofilm. Geringe Konzentrationen an Citrat stimulieren sowohl die Adhäsion der Bakterienzellen an Oberflächen als auch die Zell-Zell-Interaktionen und unterdrücken die PIA Produktion [Shanks *et al.*, 2008], wobei höhere Konzentrationen toxisch auf die Mikroorganismen wirken. Der genaue Mechanismus der Biofilm Stimulation durch Citrat ist unbekannt. Allerdings wird die Expression der SarA und  $\sigma^B$  regulierten FnBPAB durch Citrat angeregt,

was die Zell-Oberflächenbindung begünstigt. Während die PIA-Produktion im Fall einer Beeinträchtigung der Zitratzyklusaktivität angeregt wird [Vuong *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2009], fördert das Zitratzyklusintermediat Citrat ebenso wie Isocitrat, Succinat, Fumarat, Malat und Oxalacetat einen aktiven Zitratzyklus und die Biofilmbildung über die Expression der FnBPAB [Shanks *et al.*, 2008]. Im weiteren Verlauf der Biofilmbildung produzieren die Bakterien zudem eine extrazelluläre Matrix, die zu einem großen Teil aus eDNA (extrazelluläre DNA) besteht. Diese spielt eine wichtige Rolle bei der Anheftung an inerte und dynamische Oberflächen [Steinberger & Holden, 2005]. Es handelt sich bei eDNA um chromosomale DNA, die durch eine kontrollierte Lyse von Bakterienzellen frei wird. Diese DNA-Freisetzung durch Lyse der Zellen ist ein entscheidender Vorgang bei der Formation eines ausgereiften Biofilms, wobei die Bakterien anhand von Proteasen und Nukleasen, wie z.B. der Thermonuclease Nuc, einen aktiven Ausgleich zwischen freigelassener DNA und Abbau dieser vornehmen [Mann *et al.*, 2009].

Die Biofilmbildung des Stammpaars DSM20231/PBM001 war identisch (Kap. 4.6). Zwar beschrieben Frees *et al.* [2004], dass eine *clpC*-Mutante eine verringerte Zell-Zell-Interaktion und damit Biofilmbildung aufweist, P. Becker [2002] hingegen konnte ebenfalls keinen Unterschied in der Biofilmbildung von DSM20231 und der *clpC*-Mutante PBM001 feststellen. Vuong *et al.* [2005] beschrieben eine signifikante Erhöhung der PIA Produktion, wenn eine Beeinträchtigung der Zitratzyklusaktivität vorliegt. Da die *clpC*-Mutante einen reduzierten Zitratzyklus besitzt [Chatterjee *et al.*, 2005], wäre eine verstärkte Zell-Zell-Interaktion durch eine möglicherweise erhöhte Synthese des Polysaccharid Intercellular Adhesins und somit Biofilmbildung von PBM001 zu erwarten gewesen. Zudem ist die Zitratzyklusaktivität mit der Synthese von Virulenzfaktoren und Regulatoren der Virulenzfaktoren wie z.B. RNAlII verbunden [Somerville *et al.*, 2002; Somerville *et al.*, 2003], wobei die PIA Expression nicht durch *agr* reguliert wird [Vuong & Otto, 2002; Vuong *et al.*, 2003]. Anhand des *agr*-Lokus erfolgt stattdessen eine negative Regulation der meisten MSCRAMM's [Bowden *et al.*, 2005; Novick, 2003; Patti *et al.*, 1994]. Damit hat der *agr*-Lokus einen negativen Einfluss auf die primäre Phase der Biofilmbildung, nämlich der Adhäsion der *S. aureus* Zellen an Oberflächen. Denkbar wäre, dass durch den vermuteten *agr*-Defekt des Isolats DSM20231 dieser negative Effekt entfällt und damit sowohl der Wildtyp als auch die isogene *clpC*-Mutante eine gute Bindung an die im Experiment vorhandene well-Oberfläche aufwiesen, wodurch wiederum

kein Unterschied in der Biofilmbildung erkennbar war. Obwohl der *agr*-Einfluss auf die Formation eines Biofilms außerdem maßgeblich von den experimentellen Konditionen abhängt, unter denen die Biofilmbildung untersucht wurde [Yarwood *et al.*, 2004], konnte unter den in dieser Arbeit vorliegenden Bedingungen, bei denen zum einen *S. aureus* Zellen in der stationären und zum anderen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet wurden, kein Unterschied identifiziert werden [Kap. 4.6].

## 5.1 Ausblick

Die in Transkriptionsanalysen beobachtete sehr niedrige *RNAIII* Transkription in DSM20231 weist auf einen Defekt im *agr*-Lokus hin. Um den vermuteten Defekt in dem quorum-sensing System von DSM20231 eindeutig identifizieren zu können, wäre in erster Linie eine Sequenzierung des *agr*-Lokus dieses Isolates sinnvoll. Da ein deutlich erhöhtes *in vitro* Überleben nach *clpC* Inaktivierung nur beim Isolat DSM20231 beobachtet wurde, könnte zudem durch Langzeitwachstumsexperimente mit isogenen SH1000, LS1 und Newman T.F. *agr*- und *clpC*-Einzel- bzw. Doppelmутanten untersucht werden, ob ein etwaiger Defekt im *agr*-Lokus bei DSM20231 in Verbindung mit einem nicht funktionellen *clpC* zu dem markant erhöhten Überleben von PBM001 führt. Trotz der nachweislich sehr geringen Transkription des *agr*-Lokus in DSM20231 war nach 96 Std. intrazellulärer Lokalisation der *clpC*-Mutante PBM001 in EA.hy926-Zellen eine klare Abnahme der Transkription von *RNAIII* und des von diesem in der Expression positiv beeinflussten Virulenzfaktors Hla ( $\alpha$ -Hämolysin), sowie ebenfalls von  $\sigma^B$  und SarA, zu verzeichnen. Diese verringerte mRNA Transkription von an der Virulenz von *S. aureus* beteiligter Regulatoren/Virulenzfaktoren lässt darauf schließen, dass intrazellulär persistierende *S. aureus clpC*-Mutanten eine verringerte Virulenz aufweisen. Inwiefern diese mutmaßliche Attenuierung für das verbesserte Langzeitüberleben der Mutante von Bedeutung ist, ist noch zu analysieren.

Im Maus-Abszess-Modell zeigte sich 4 Tage nach Infektionsbeginn ein deutlicher Anstieg in der Anzahl an PBM001 Zellen in der Leber. Da solch ein Befund üblicherweise als eine gesteigerte Virulenz interpretiert wird, wäre es nötig zu wissen, ob sich auch die Anzahl an Abszessen erhöht hat. Auch die vermehrte Ausschüttung wirtsseitiger Infektionsmarker wie Cytokine wäre ein Hinweis auf eine erhöhte Virulenz. Nichts desto trotz kann mit dem

---

derzeitigen Wissensstand angenommen werden, dass ein Fehlen von ClpC auf das Überleben sowohl in eukaryoten Wirtszellen als auch innerhalb der Leber von Vorteil für *S. aureus* ist.

Alles in allem wurde anhand dieser Arbeit erstmals mit dem Nachweis der intrazellulären Persistenz *in vivo* eine wichtige Rolle in einer reduzierten bzw. fehlenden ClpC Aktivität in persistierenden *S. aureus* Infektionen bestärkt. Inwieweit neben der fehlenden ClpC Aktivität auch die erhöhte Menge des molekularen Chaperons ClpB in *S. aureus* Zellen ohne ClpC eine Rolle im Langzeitüberleben dieses opportunistischen Pathogens spielt, gilt es noch zu entschlüsseln. Die Bedeutung der deutlich erhöhten Menge an ClpB in der *clpC*-Mutante für das Langzeitüberleben von *S. aureus* lässt sich nur über die Untersuchung einer *clpBC*-Doppelmutante bzw. einer *clpB* überexprimierenden Mutante ermitteln. Eine solche DSM20231 *clpB clpC*-Doppelmutante konnte im Rahmen dieser Arbeit noch generiert, jedoch nicht mehr ausreichend phänotypisch charakterisiert werden. Erste Untersuchungen mit dieser Doppelmutante weisen aber darauf hin, dass zumindest ein Teil des positiven Effektes der *clpC*-Mutante auf das Langzeitüberleben aus einer erhöhten ClpB Produktion resultieren könnte.

## Literaturverzeichnis

- Arber W. & Kinn S. (1969)** DNA modification and restriction. *Annu. Rev. Biochem.* 38: 467-500.
- Arvidson S. & Tegmark K. (2001)** Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 159-170.
- Babra C., Tiwari J. G., Pier G., Thein T. H., Sunagar R., Sundareshan S., Isloor S., Hegde N. R., de Wet S., Deighton M., Gibson J., Costantino P., Wetherall J. & Mukkur T. (2013)** The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiol. (Praha)*. [Epub ahead of print]
- Balwit J. M., van Langevelde P., Vann J. M., & Proctor R. A. (1994)** Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 170: 1033-1037.
- Banner M. A., Cuniffe J. G., Macintosh R. L., Foster T. J., Rohde H., Mack D., Hoyes E., Derrick J., Upton M. & Handley P. S. (2007)** Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J. Bacteriol.* 189: 2793–2804.
- Bantel H., Sinha B., Domschke W., Peters G., Schulze-Osthoff K. & Jannicke R. U. (2001)** alpha-Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and inactivates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J. Cell Biol.* 155: 637-648.
- Bayer M. G., Heinrichs J. H. & Cheung, A. L. (1996)** The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178: 4563-4570.
- Bayles K. W., Wesson C. A., Liou L. E., Fox L. K., Bohach G. A. & Trumble W. R. (1998)** Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66(1): 336-342.
- Becerra M. C. & Albasa I. (2002)** Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297: 1003-7.
- Becker P. (2002)** Komprehensive Genexpressions-Analyse sessiler und planktonischer Populationen von *Staphylococcus aureus* DSM20231: Genetische und funktionelle Charakterisierung des *clpC* Gens als Paradigma differentiell exprimierter Transkripte. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster.
- Becker P., Hufnagle W., Peters G. & Herrmann M. (2001)** Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. *Appl. Env. Microbiol.* 67(7):2958-2965.



- Beenken K. E., Blevins J. S. & Smeltzer M. S. (2003)** Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect. Immun.* 71: 4206-4211.
- Bhakdi S. & Tranum-Jensen J. (1991)** Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 55(4): 733-751.
- Bischoff M. & Berger-Bächi B. (2001)** Teicoplanin stress-selected mutations increasing sigma(B) activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45: 1714-1720.
- Bischoff M., Dunman P., Kormanec J., Macapagal D., Murphy E., Mounts W., Berger-Bächi B. & Projan S. (2004)** Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* sigma B regulon. *J. Bacteriol.* 186: 4085-4099.
- Bischoff M., Entenza J. M. & Giachino P. (2001)** Influence of a Functional *sigB* Operon on the Global Regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183: 5171-5179.
- Bochtler M., Hartmann C., Song H. K., Bourenkov G. P., Bartunik H. D. & Huber R. (2000)** The structure of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV. *Nat.* 403: 800-5.
- Boisset S., Geissmann T., Huntzinger E., Fechter P., Bendridi N., Possedko M., Chevalier C., Helfer A. C., Benito Y., Jacquier A., Gaspin C., Vandenesch F. & Romby P. (2007)** *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factor and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev.* 21: 1353-1366.
- Bowden M. G., Chen W., Singvall J., Xu Y., Peacock S. J., Valtulina V., Speziale P. & Höök M. (2005)** Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol.* 151: 1453-1464.
- Breitkreutz D., Stark H. J., Plein P., Baur M. & Fusenig N. E. (1993)** Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Dif.* 54(3): 201-217.
- Bremell T., Abdelnour A. & Tarkowski A. (1992)** Histopathological and Serological Progression of Experimental *Staphylococcus aureus* Arthritis. *Infect. Immun.* 60(7): 2976-2985.
- Bronner S., Monteil H. & Prevost G. (2004)** Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 183-200.
- Brotz-Oesterhelt H., Beyer D., Kroll H.P., Endermann R., Ladel C., Schroeder W., Hinzen B., Raddatz S., Paulsen H., Henninger K., Bandow J. E., Sahl H. G. & Labischinski H. (2005)** Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat. Med.* 11: 1082-1087.
- Brown M. R., Allison D. G. & Gilbert P. (1988)** Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J. Antimicrob. Chemother.* 22(6): 777-780.
- Brown M. R. & Williams P. (1985)** Influence of substrate limitation and growth phase on sensitivity to antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 15 Suppl. A:7-14.

- Brückner R. (1997)** Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. FEMS Microbiol. Lett. 151: 1-8.
- Bulger R. J. & Bulger R. E. (1976)** Ultra structure of small colony variants of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 94: 1244-1246.
- Bur S., Preissner K. T., Herrmann M. & Bischoff M. (2013)** The *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein (Eap) Promotes Bacterial Internalisation by Keratinocytes Independent of Fibronectin-binding Proteins. J. Invest. Dermatol. (Epub ahead of print).
- Butler S. M., Festa R. A., Pearce M. J. & Darwin H. (2006)** Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. Mol. Microbiol. 60(3): 553-562.
- Campoy E. & Colombo M. I. (2009)** Autophagy in intracellular bacterial infection. Biochim. Biophys. Acta 1793: 1465-1477.
- Casewell M. W. & Hill R. L. R. (1986)** The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 18: 1-12.
- Chambers H. F., Korzeniowski O. M. & Sande M. A. (1983)** *Staphylococcus aureus* endocarditis: clinical manifestations in addicts and nonaddicts. Med. (Baltimore) 62: 170-177.
- Chan P. F. & Foster S. J. (1998)** The role of environmental factors in the regulation of virulence-determinant expression in *Staphylococcus aureus* 8325-4. Microbiol. 144 (Pt 9): 2469-2479.
- Chan P. F., Foster S. J., Ingham E. & Clements M. O. (1998)** The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor sigmaB controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. J. Bacteriol. 180: 6082-9.
- Chastanet A., Fert, J. & Msadek T. (2003)** Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. Mol. Microbiol. 47: 1061-1073.
- Chatterjee I. (2005)** Senescence of Staphylococci: metabolic and environmental factors determining bacterial survival and persistence. Dissertation, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum des Saarlandes.
- Chatterjee I., Becker P., Grundmeier M., Bischoff M., Somerville G. A., Peters G., Sinha B., Harraghy N., Proctor R. A. & Herrmann M. (2005)** *Staphylococcus aureus* ClpC is required for stress resistance, aconitase activity, growth recovery, and death. J. Bacteriol. 187: 4488-4496.
- Chatterjee I., Herrmann M., Proctor R. A., Peters G. & Kahl B. C. (2007)** Enhanced Post-Stationary-Phase Survival of a Clinical Thymidine-Dependent Small-Colony Variant of *Staphylococcus aureus* Results from Lack of a Functional Tricarboxylic Acid Cycle. J. Bacteriol. 189: 2936-2940.

- Chatterjee I., Neumeyer D. & Herrmann M. (2009a)** Senescence of staphylococci: using functional genomics to unreveal the roles of ClpC ATPase during late stationary phase. *Int. J. of Med. Microbiol.* 300: 130-136.
- Chatterjee I., Schmitt S., Batzilla C. F., Engelmann S., Keller A., Ring M. W., Kautenburger R., Ziebuhr W., Hecker M., Preissner K. T., Bischoff M., Proctor R. A., Beck H. P., Lenhof H.-P., Somerville G. A. & Herrmann M. (2009b)** *Staphylococcus aureus* ClpC ATPase is a late growth phase effector of metabolism and persistence. *Proteom.* 9(5): 1152-76.
- Chatterjee I., Somerville G. A., Heilmann C., Sahl H.-G., Maurer H. H. & Herrmann M. (2006)** Very Low Ethanol Concentrations Affect the Viability and Growth Recovery in Post-Stationary-Phase *Staphylococcus aureus* Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(4): 2627–2636.
- Chavakis T., Preissner K. T. & Herrmann M. (2007)** The anti-inflammatory activities of *Staphylococcus aureus*. *Trends Immunol.* 28: 408-418.
- Chavakis T., Wiechmann K., Preissner K. T. & Herrmann M. (2005)** *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: The role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb. Haemost.* 94: 278-285.
- Cherny I. & Gazit E. (2004)** The YefM antitoxin defines a family of natively unfolded proteins: implications as a novel antibacterial target. *J. Biol. Chem.* 279: 8252-8261.
- Chesney P. J., Davis J. P., Purdy W. K., Wand P. J. & Chesney R. W. (1981)** Clinical manifestations of toxic shock syndrome. *JAMA* 246: 741-748.
- Cheung A. L., Bayer M. G. & Heinrichs J. H. (1997)** *sar* Genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAPIII in the *agr* locus of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179(12): 3963-3971.
- Cheung A. L., Bayer A. S., Zhang G. Y., Gresham H. & Xiong Y. Q. (2004)** Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40: 1-9.
- Cheung A. L., Koomey J. M., Butler C. A., Projan S. J. & Fischetti V. A. (1992)** Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6462-6466.
- Cheung A. L., Projan S. J. & Gresham H. (2002)** The genomic aspect of virulence, sepsis, and resistance to killing mechanisms in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 4: 400–410.
- Cheung A. L. & Zhang G. (2002)** Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA protein family. *Front. Biosci.* 7: d1825-d1842.
- Chien Y. T. & Cheung A. L. (1998)** Molecular interactions between two global regulators, *sar* and *agr*, in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 273: 2645-2652.

- Chuard C., Lucet J.-C., Rohner P., Herrmann M., Auckenthaler R., Waldvogel F. A. & Lew D. (1991)** Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body *in vivo* to killing by Antimicrobials. J. Infect. Dis. 163:1369-1373.
- Clarke A. K. (1996)** Variations on a theme: Combined molecular chaperone and proteolysis functions in Clp/HSP100 proteins. J. Biosci. 21: 161-177.
- Conlon K. M., Humphreys H. & O'Gara J. P. (2002)** *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. J. Bacteriol. 184: 4400-4408.
- Costerton J. W., Stewart P. S. & Greenberg E. P. (1999)** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284(5418):1318-1322.
- Cramton S. E., Gerke C., Schnell N. F., Nichols W. W. & Götz F. (1999)** The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect. Immun. 67(10): 5427-5433.
- Crossley K. B. & Archer G. L. (eds.) (1997)** The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone Inc., New York.
- Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I. & Penades J. R. (2001)** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J. Bacteriol. 183: 2888–2896.
- Deora R., Tseng T. & Misra T. K. (1997)** Alternative transcription vector  $\sigma^{SB}$  of *Staphylococcus aureus*: characterization and role in transcription of the global regulatory locus *sar*. J. Bacteriol. 179: 6355-6359.
- Depke M., Burian M., Schäfer T., Bröker B. M., Ohlsen K. & Völker U. (2012)** The alternative sigma factor B modulates virulence gene expression in a murine *Staphylococcus aureus* infection model but does not influence kidney gene expression pattern of the host. Int. J. Med. Microbiol. 302(1): 33-9.
- Derre I., Rapoport G. & Msadek T. (1999)** CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. Mol. Microbiol. 31: 117-132.
- Derre I., Rapoport G. & Msadek T. (2000)** The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded *in vivo* at 37° C. Mol. Microbiol. 38: 335-347.
- Deurenberg R.H. & Stobberingh E.E. (2008)** The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect. Genet. Evol. 6: 747-763.
- Donegan N. P. & Cheung A. L. (2009)** Regulation of the *mazEF* Toxin-Antitoxin Module in *Staphylococcus aureus* and Its Impact on *sigB* Expression. J. Bacteriol. 191(8): 2795-2805.

**Donegan N. P., Thompson E. T., Fu Z. & Cheung A. L. (2010)** Proteolytic Regulation of Toxin-Antitoxin Systems by ClpPC in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 192(5): 1416-1422.

**Duthie S. & Lorenz L. (1952)** Staphylococcal Coagulase: Mode of Action and Antigenicity. J. gen. Microbiol. 6: 95-107.

**Dziewanowska K., Carson A. R., Patti J. M., Deobald C. F., Bayles K. W. & Bohach G. A. (2000)** Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: Role in internalization by epithelial cells. Infect. Immun. 68: 6321-6328.

**Dziewanowska K., Patti J. M., Deobald C. F., Bayles K. W., Trumble W. R. & Bohach G. A. (1999)** Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. Infect. Immun. 67(9): 4673-4678.

**Edgell C.-J. S., McDonald C. C. & Graham J. B. (1983)** Permanent cell line expressing human factorVIII-related antigen established by hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3734.

**Edwards A. M., Bowden M. G., Brown E. L., Laabei M. & Massey R. C. (2012)** *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein triggers TNF $\alpha$  release, promoting attachment to endothelial cells via protein A. PLoS One. 7(8): e43046.

**Entenza J. M., Moreillon P., Senn M. M., Kormanec J., Dunman P. M., Berger-Bächi B., Projan S. & Bischoff M. (2005)** Role of sigmaB in the expression of *Staphylococcus aureus* cell wall adhesins ClfA and FnbA and contribution to infectivity in a rat model of experimental endocarditis. Infect. Immun. 73(2): 990-8.

**Fernandez-Guerrero M. L., Verdejo C., Azofra J. & de Gorgolas M. (1995)** Hospital-acquired infectious endocarditis not associated with cardiac surgery: an emerging problem. Clin. Infect. Dis. 20: 16-23.

**Finley B. B. & Falkow S. (1997)** Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 136-169.

**Fischetti V. A., Pancholi V. & Schneewind O. (1990)** Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. Mol. Microbiol. 4(9): 1603-1605

**Flanagan J. M., Wall J. S., Capel M. S., Schneider D. K. & Shanklin J. (1995)** Scanning transmission electron microscope and small-angle scattering provide evidence that native *Escherichia coli* ClpP is a tetradecamer with an axial pore. Biochem. 34: 10910-10917.

**Foster T. J. & McDevitt D. (1994)** Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. FEMS Microbiol. Lett. 118: 199-205.

**Foster T. J. & Höök M. (1998)** Surface protein adhesions of *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 6: 484-488.

- Fowler T., Wann E. R., Joh D., Johansson S., Foster T. J. & Höök M. (2000)** Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Europ. J. Cell Biol.* 79(10): 672-679.
- Frees D., Chastanet A., Qazi S., Sørensen K., Hill P., Msadek T. & Ingmer H. (2004)** Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 54: 1445-1462.
- Frees D., Qazi S. N., Hill P. J. & Ingmer H. (2003)** Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. *Mol. Microbiol.* 48: 1565-78.
- Frees D., Thomsen L. E. & Ingmer H. (2005)** *Staphylococcus aureus* ClpYQ plays a minor role in stress survival. *Arch. Microbiol.* 183: 286-291.
- Fu Z., Doneagn N. P., Memmi G. & Cheung A. C. (2007)** Characterization of MazF<sub>SA</sub>, an Endoribonuclease from *Staphylococcus aureus*. : *Bacteriol.* 189(24): 8871-8879.
- Gardner P. R. & Fridovich I. (1992)** Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *J. Biol. Chem.* 267: 8757-8763.
- Gardner J. F. & Lascelles J. (1962)** The requirement for acetate of a streptomycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 29: 157-164.
- Garzoni C. & Kelley W. L. (2009)** *Staphylococcus aureus*, new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* 17: 59-65.
- Gerdes K., Christensen S. K. & Lobner-Olesen A. (2005)** Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 371-382.
- Gerke C., Kraft A., Süssmuth R., Schweitzer O. & Götz F. (1998)** Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 273(29): 18586-18593.
- Gertz S., Engelmann S., Schmid R., Ohlsen K., Hacker J. & Hecker M. (1999)** Regulation of sigmaB-dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol. Gen. Genet.* 261: 558-566.
- Gertz S., Engelmann S., Schmid R., Ziebandt A. K., Tischer K., Scharf C., Hacker J. & Hecker M. (2000)** Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182: 6983-6991.
- Giachino P., Engelmann S. & Bischoff M. (2001)** Sigma(B) activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183: 1843-1852.
- Giese B., Glowinski F., Paprotka K., Dittmann S., Steiner T., Sinha B. & Fraunholz J. (2011)** Expression of  $\delta$ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in presence of  $\beta$ -toxin. *13(2)*: 316-329.

- Gilligan P. H., Gage P. A., Welch D. F., Muszynski M. J. & Wait K. R. (1987)** Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 25: 1258-1261.
- Gordon C. P., Williams P. & Chan W. C (2013)** Attenuating *Staphylococcus aureus* Virulence Gene Regulation: A Medicinal Chemistry Perspective. J. Med. Chem. 56(4): 1389–1404.
- Greer III R. B. & Rosenberg A.E. (1993)** Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 6-1993. N. Engl. J. Med. 328: 422-428.
- Groll M., Bochtler M., Brabdstetter H., Clausen T. & Huber R. (2005)** Molecular machines for protein degradation. Chembiochem. 6: 222-256.
- Gresham H. D., Lowrance J. H., Caver T. E., Wilson B. S., Cheung A. L. & Lindberg F. P. (2000)** Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. J. Immunol. 164(7): 3713-22.
- Grundmeier M., Tuchscher L., Brück M., Viemann D., Roth J., Willscher E., Becker K., Peters G. und Löffler B. (2010)** Staphylococcal Strains Vary Greatly in Their Ability to Induce an Inflammatory Response in Endothelial Cells. J. Infect. Dis. 201: 871–880.
- Hackstadt T. (2000)** Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. Traffic 1: 93-99.
- Haggar A., Hussain M., Lonnie H., Herrmann M., Norrby-Teglund A. & Flock J. I. (2003)** Extracellular Adherence Protein from *Staphylococcus aureus* Enhances Internalization into Eukaryotic Cells. Infect. Immun. 71: 2310-2317.
- Hahn H., Falke D. & Klein P. (eds.) (1994)** Medizinische Mikrobiologie. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Hamill R. J., Vann J. M. & Proctor R. A. (1986)** Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells, model for postadherence events in endovascular infections. Infect. Immun. 54: 833-836.
- Hartleib J., Köhler N., Dickinson R. B., Chhatwal G. S., Sixma J. J., Hartford O. M., Foster T. J., Peters G., Kehrel B. E. & Herrmann M. (2000)** Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. Blood. 96(6): 2149-56.
- Haslinger B., Strangfeld K., Peters G., Schulze-Osthoff K. & Sinha B. (2003)** *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway. Cell. Microbiol. 5: 729-741.
- Haslinger-Löffler B., Kahl B. C., Grundmeier M., Strangfeld K., Wagner B., Fischer U., Cheung A. L., Peters G., Schulze-Osthoff K. & Sinha B. (2005)** Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. Cell. Microbiol. 7(8): 1087-1097.

**Hasslinger-Löffler B., Wagner B., Bruck M., Strangfeld K., Grundmeier M., Fischer U., Volker W., Peters G., Schulze-Osthoff K. & Sinha B. (2006)** *Staphylococcus aureus* induces caspase-independent cell death in human peritoneal mesothelial cells. *Kid. Int.* 70: 1089-1098.

**Hattori T. & Hattori R. (1976)** The physical environment in soil microbiology: an attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. *CRC Crit. Revi. Microbiol.* 4(4): 423-461.

**Hecker M. & Volker U. (1998)** Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon *Mol. Microbiol.* 29: 1129-1136.

**Heilmann C. O., Heinrichs J. H., Bayer M. G. & Cheung A. L. (1996)** Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178(2): 418-423.

**Hengartner M. O. (2000)** The biochemistry of apoptosis. *Nat.* 407: 770-776.

**Herrmann M. & Peters G. (1997)** Catheter-associated infections caused by coagulase-negative staphylococci: clinical and biological aspects. In: Seifert H., Jansen B. & Farr B. M. (eds.). *Catheter-related infections*. M. Dekker, New York, 79-109.

**Herrmann M., Vaudaux P. E., Pittet D., Auckenthaler R., Lew P. D., Schumacher-Perdreau F., Peters G. & Waldvogel F. A. (1988)** Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J. Infect. Dis.* 158(4): 693-701.

**Herrmann M., Weyand M., Greshake B., von Eiff C., Proctor R. A., Sheld H. H. & Peters G. (1997)** Left Ventricular Assist Device Infection Is Associated With Increased Mortality but Is Not a Contraindication to Transplantation Circulation. 95: 814-817.

**Hill G. B., Osterhout S. & Pratt P. C. (1974)** Liver Abscess Production by Non-Spore-Forming Anaerobic Bacteria in a Mouse Model. *Infect. Immun.* 9(3): 599-603.

**Hof H. (1998)** Können Antibiotika auf intrazelluläre Bakterien wirken? *Chemoth. J.* 7(3): 77-85.

**Hogt A. H., Dankert J., Hulstaert C. E. & Feijen J. (1986)** Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to fluorinated poly(ethylenepropylene). *Infect. Immun.* 51(1): 294-301.

**Horsburgh M. J., Aish J. L., White I. J., Shaw L., Lithgow J. K. & Foster S. J. (2002)** sigma B modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional *rsbU* strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Bacteriol.* 184: 5457-5467.

**Hoskins J. R., Kim S. Y. & Wickner S. (2000)** Substrate recognition by the ClpA chaperone component of ClpAP protease. *J. Biol. Chem.* 275: 35361-35367.



- Hoskins J. R., Pak M., Maurizi M. R. & Wickner S. (1998)** The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12135-12140.
- Huntzinger E., Boisset S., Saveneau C., Benito Y., Geissmann T., Namane A., Lina G., Etienne J., Ehresmann B., Ehresmann C., Jacquier A., Vandenesch F. & Romby P. (2005)** *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J.* 24: 824-835.
- Hussain M., Hagggar A., Peters G., Chhatwal G. S., Herrmann M., Flock J. I. & Sinha B. (2008)** More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect. Immun.* 76(12): 5615-23.
- Hussain M., Hastings J. G. & White P. J. (1992)** Comparison of cell-wall teichoic acid with high-molecular-weight extracellular slime material from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* 37: 368-375.
- Hussain M., Herrmann M., von Eiff C., Perdreau-Remington F. & Peters G. (1997)** A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect. Immun.* 65: 519-524.
- Hussain M., Wilcox M. H. & White P. J. (1993)** The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol. Rev.* 10: 191-207.
- Isberg R. R. & Van Nhieu G. T. (1994)** Two mammalian cell internalization strategies used by pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Gen.* 28: 395-422.
- Jacobson M. D., Weil M. & Raff M. C. (1997)** Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354.
- Jeong D. W., Cho H., Jones M. B., Shatzkes K., Sun F., Ji Q., Liu Q., Peterson S. N., He C. & Bae T. (2012)** The auxiliary protein complex SaePQ activates the phosphatase activity of sensor kinase SaeS in the SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 86(2): 331-48.
- Ji G., Beavis R. C. & Novick R. P. (1995)** Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 92(26): 12055-12059.
- Ji G., Beavis R. & Novick R. P. (1997)** Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Sci.* 276(5321): 2027-2030.
- Jonas D., Walev I., Berger T., Liebetrau M., Palmer M. & Bhakdi S. (1994)** Novel path of apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal degradation. *Infect. Immun.* 62: 1304-1312.
- Kahl B. C. (2013)** Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* - A bacterial survival strategy. *Infect. Genet. Evol.* [Epub ahead of print]

- Kahl B. C., Belling G., Becker P., Chatterjee I., Eardecki K., Hilgert K., Cheung A. L., Peters G. & Herrmann M. (2005)** Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. *Infect. Immun.* 73: 4119-4126.
- Kahl, B. C., Belling G., Reichelt R., Herrmann M., Proctor R. A. & Peters G. (2003)** Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J. Clin. Microbiol.* 41: 410-413.
- Kahl B. C., Goulian M., Van Wamel W., Herrmann M., Simon S. M., Kaplan G., Peters G. & Cheung A. L. (2000)** *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in pulmonary epithelial cell line. *Infect. Immun.* 68: 5385-5392.
- Karlsson A. & Arvidson S. (2002)** Variation in Extracellular Protease Production among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Due to Different Levels of Expression of the Protease Repressor *sarA*. *Infect. Immun.* 70: 4239-4246.
- Kazemzadeh-Narbat M., Lai B. F., Ding C., Kizhakkedathu J. N., Hancock R. E., Wang R. (2013)** Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials.* 34(24): 5969-77.
- Kennedy M. C., Emptage M. H., Dreyer J. L. & Beinert H. (1983)** The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *J. Biol. Chem.* 258: 11098-105.
- Kennedy M. C., Werst M., Telser J., Emptage M. H., Beinert H. & Hoffman B. M. (1987)** Mode of substrate carboxyl binding to the [4Fe-4S]<sup>+</sup> cluster of reduced aconitase as studied by 17O and 13C electron-nuclear double resonance spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8854-8858.
- Kintarak S., Whawell S. A., Speight P. M., Packer S. & Nair S. P. (2004)** Internalization of *Staphylococcus aureus* by Human Keratinocytes. *Infect. Immun.* 72(10): 5668–5675.
- Kipp F., Ziebuhr W., Becker K., Krimmer V., Hobeta N., Peters G. & von EC (2003)** Detection of *Staphylococcus aureus* by 16S rRNA directed *in situ* hybridisation in a patient with a brain abscess caused by small colony variants. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 74: 1000-1002.
- Knobloch J. K., Bartscht K., Sabottke A., Rohde H., Feucht H. H. & Mack D. (2001)** Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J. Bacteriol.* 183: 2624-2633.
- Kohler C., von Eiff C., Peters G., Proctor R. A., Hecker M. & Engelmann S. (2003)** Physiological characterization of a heme-deficient mutant of *Staphylococcus aureus* by a proteomic approach. *J. Bacteriol.* 185: 6928-37.

- Kreiswirth B. N., Lofdahl S., Betley M. J., O'Reilly M., Schlievert P. M., Bergdoll M.S. & Novick R. P. (1983)** The toxic shock exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305: 709-712.
- Krüger E., Witt E., Ohlmeier S., Hanschke R. & Hecker M. (2000)** The clp proteases of *Bacillus subtilis* are directly involved in degradation of misfolded proteins. *J. Bacteriol.* 182: 3259-3265.
- Krüger E., Zuhlke D., Witt E., Ludwig H. & Hecker M. (2001)** Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *EMBO J.* 20: 852-863.
- Kubica M., Guzik K., Koziel J., Zarebski M., Richter W., Gajkowska B., Golda A., Maciag-Gudowska B., Brix K., Shaw K., Foster T. & Potempa J. (2008)** A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PloS ONE* 3, e1409. Doi: 10.1371/journal.pone.0001409.
- Kullik I. & Giachino P. (1997)** The alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus*: regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. *Arch. Microbiol.* 167: 151-159.
- Kullik I. Giachino P. & Fuchs T. (1998)** Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J. Bacteriol.* 180: 4814-20.
- Kuroda H., Kuroda M., Cui L. & Hiramatsu K. (2007)** Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol. Lett.* 268(1): 98-105.
- Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L. Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi N. K., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabuzaki J., Kanehisa M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshino C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H. & Hiramatsu K. (2001)** Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357(9264): 1225-1240.
- Leibig M., Krismer B., Kolb M., Friede A., Götz F. & Bertram R. (2008)** Marker Removal in *Staphylococci* via Cre Recombinase and Different *lox* Sites. *App. Env. Microbiol.* 74(5): 1316-1323.
- Libman H. & Arbeit R. D. (1984)** Complications associated with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Arch. Intern. Med.* 144: 541-545.
- Lina G., Jarraud S., Ji G., Greenland T., Pedraza A., Etienne J., Novick R. P. & Vandenesch F. (1998)** Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 28(3): 655-662.

- Linares J. (2001)** The VISA/GISA problem: therapeutic implications. Clin. Microbiol. Inf. 7 Suppl. 4: 8-15.
- Lobo R. & Mulloy E. M. (2012)** An unusual cause for recurrent chest infections. BMJ Case Rep. doi: 10.1136/bcr-2012-006910.
- Looney W. J. (2000)** Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Brit. J. Biomed. Sci. 57(4): 317-322.
- Lowy F. D. (1998)** *Staphylococcus aureus* infections. The New England Journal of Medicine 339: 520-532.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr L. & Randall R. J. (1951)** Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 267-275.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H. & Laufs, R. (1996)** The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J. Bacteriol. 178: 175–183.
- Magnuson R. D. (2007)** Hypothetical functions of toxin-antitoxin systems. J. Bacteriol. 189: 6089-6092.
- Mainiero M., Goerke C., Geiger T., Gonser C., Herbert S. & Wolz C. (2010)** Differential Target Gene Activation by the *Staphylococcus aureus* Two-Component System *saeRS*. J. Bacteriol. 192(3): 613-623.
- Majerczyk C. D., Sadykov M. R., Luong T. T., Lee C., Somerville G. A. & Sonenshein A. L. (2008)** *Staphylococcus aureus* CodY negatively regulates virulence gene expression. J. Bacteriol. 190: 2257-2265.
- Mann E. E., Rice K. C., Boles B. R., Endres J. L., Ranjit D., Chandramohan L., Tsang L. H., Smeltzer M., Horswill A. R. & Bayles K. W. (2009)** Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. PLoS ONE 4: e5822.
- Manna A. C., Bayer M. G. & Cheung A. L. (1998)** Transcriptional analysis of different promoters in the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 180: 3828-3836.
- Manna A. & Cheung A. L. (2001)** Characterization of *sarR*, a modulator of *sar* expression in *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 69: 885-896.
- Marmur J. (1961)** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3: 202-212.
- Menzies B. E. & Kourteva I. (1998)** Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. Infect. Immun. 66: 5994-5998.

- Meresse S., Steele-Mortimer O., Moreno E., Desjardins M., Finlay B. & Gorvel J. P. (1999)** Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat. Cell. Biol.* 1: E183-E188.
- Mitchell G., Brouillette E., Seguin D. L., Asselin A. E., Jacob C. L. & Malouin F. (2010)** A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. *Microb. Pathog.* 48: 18–27.
- Mitchell G., Fugère A., Pépin Gaudreau K., Brouillette E., Frost E. H., Cantin A. M. & Malouin F. (2013)** SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants. *PLoS One.* 8(5): e65018.
- Mitchell G., Lamontagne C.-A., Brouillette E., Grondin G., Talbot B. G., Grandbois M. & Malouin F. (2008)** *Staphylococcus aureus* SigB activity promotes a strong fibronectin–bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* 70(6): 1540–1555.
- Moisan H., Brouillette E., Jacob E., Langlois-Begin C. L., Michaud S. & Malouin F. (2006)** Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J. Bacteriol.* 188: 64-76.
- Morfeldt E., Janzon L., Arvidson S. & Löfdahl S. (1988)** Cloning of a chromosomal locus (*exp*) which regulates the expression of several exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 211: 435-440.
- Mylotte J. M., McDermott C. & Spooner J. A. (1987)** Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Rev. Infect. Dis.* 9: 891-907.
- Nair S. P., Bischoff M., Senn M. M. & Berger-Bächi B. (2003)** The sigmaB regulon influences internalization of *Staphylococcus aureus* by osteoblasts. *Infect. Immun.* 71: 4167-4170.
- Neuwald A. F., Aravind L., Spouge J. L. & Koonin E. V. (1999)** AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9: 27-43.
- Nicholas R. O., Tong L., McDevitt D., Marra A., Socoloski S., Demarsh P. L. & Gentry D. R. (1999)** Isolation and characterization of a *sigB* deletion mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 67: 3667-3669.
- Nichols W. W., Dorrington S. M., Slack M. P. & Walmsley H. L. (1988)** Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(4): 518-523.
- Noble W. C., Valkenburg H.A. & Wolters C.H.L. (1967)** Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J. Hyg. (Lond)* 65: 567-573.

- Novick R. P. (2000)** Pathogenicity factors and their regulation. In: Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., and Rood, J. I. (eds.). *Gram-Positive Pathogens*. ASM Press, Washington DC , 392-413.
- Novick R. P. (2003)** Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 48: 1429-1449.
- Novick R. P., Ross H. F., Projan S. J., Kornblum J., Kreiswirth, B. & Moghazeh S. (1993)** Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 12(10): 3967-3975.
- Nuzzo I., Sanges M. R., Folgore A. & Carratelli C. R. (2000)** Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27: 235-240.
- Ogawa M., Mimuro H., Yoshikawa Y., Ashida H. & Sasakawa C. (2011)** Manipulation of autophagy by bacteria for their own benefit. *Microbiol. Immunol.* 55: 459-471.
- Ogawa S. K., Yurberg E. R., Hatcher V. B., Levitt M. A. & Lowy F. D. (1985)** Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 50: 218–224.
- Olivier A. C., Lemaire S., Van Bambeke F., Tulkens P. M. & Oldfield E. (2009)** Role of *rsbU* and staphyloxanthin in phagocytosis and intracellular growth of *Staphylococcus aureus* in human macrophages and endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 200: 1367–70.
- O'Seaghdha M., van Schooten C. J., Kerrigan S. W., Emsley J., Silverman G. J., Cox D., Lenting P. J. & Foster T. J. (2006)** *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J.* 273(21): 4831-41.
- Otto M. (2008)** Staphylococcal Biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 207–228.
- Palma M., Haggar A. & Flock J. I. (1999)** Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J. Bacteriol.* 181: 2840-2845.
- Pandey D. P & Gerdes K. (2009)** Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33: 966-976.
- Pascual, A.; Fleer, A.; Westerdaal, N. A.; Verhoef, J. (1986)** Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to teflon catheters *in vitro*. *Europ. J. Clin. Microbiol.* 5(5): 518-522.
- Patti J. M., Allen B. L., McGavin M. J. & Höök M. (1994)** MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Ann. Revi. Microbiol.* 48: 585-617.
- Peacock S. J., Foster T. J., Cameron B. J. & Berendt A. R. (1999)** Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbil.* 145: 3477–3486.

**Peng H. L., Novick R. P., Kreiswirth B., Kornblum J. & Schlievert P. (1988)** Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 170(9): 4365-4372.

**Proctor R. A., Kahl B., von Eiff C., Vaudaux P. E., Lew D. P. & Peters G. (1998)** Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. Clin. Infect. Dis. 27 Suppl. 1: S68-S74.

**Proctor R. A. & Peters G. (1998)** Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. Clin. Infect. Dis. 27: 419-422.

**Proctor R. A., van Langevelde P., Kristjansson M., Maslow J. N. & Arbeit R. D. (1995)** Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis. 20(1): 95-102.

**Proctor R. A., von Eiff C., Kahl B. C., Becker K., McNamara P. J., Herrmann M. & Peters G. (2006)** Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat. Rev. Microbiol. 4: 295-305.

**Pulvirenti J. J., Kerns E., Benson C., Lisowski J., Demarais P. & Weinstein R. A. (1996)** Infective endocarditis in injection drug users: importance of human immunodeficiency virus serostatus and degree of immunosuppression. Clin. Infect. Dis. 22: 40-45.

**Raff M. (1998)** Cell suicide for beginners. Nat. 396: 119-122.

**Recsei P. B., Kreiswirth M., O'Reilly M., Schlievert P., Gruss A. & Novick W. G. (1986)** Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. Mol. Gen. Genet. 202: 58-61.

**Reid G. (1999)** Biofilms in infectious disease and on medical devices. Int. J. of Antimicrob. Agents 11(3-4): 223-226.

**Ridley R. A., Douglas I. & Whawell S. A. (2012)** Differential adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus* of epithelial cells derived from different anatomical sites. J. Med. Microbiol. 61(12): 1654-61.

**Rohde H., Burdelski C., Bartscht K., Hussain M., Buck F., Horstkotte M. A., Knobloch J. K-M., Heilmann C., Herrmann M. & Mack D. (2005)** Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. Mol. Microbiol. 55: 1883-1895.

**Sadowska B., Bonar A., von Eiff C., Proctor R. A., Chmiela M., Rudnicka W. & Rozalska B. (2002)** Characteristics of *Staphylococcus aureus*. Isolated from airways of cystic fibrosis patients and their small colony variants. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 32: 191-197.

**Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989)** Molecular cloning, a laboratory manual (2nd ed). CSH Press, New York.

- Samuelsen O., Haukland H. H., Kahl B. C., von Eiff C., Proctor R. A., Ulvatne H., Sandvic K. & Vorland L. H. (2005)** *Staphylococcus aureus* small colony variants are resistant to the antimicrobial peptide lactoferricin. *B. J. Antimicrob. Chemother.* 56: 1126-1129.
- Sandre R. M. & Shafran S. D. (1996)** Infective endocarditis: review of 135 cases over 9 years. *Clin. Infect. Dis.* 22: 276-286.
- Schaberg D. R. & Zervos M. J. (1986)** Intergeneric and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 817-822.
- Schirmer E. C., Glover J. R., Singer M. A. & Lindquist S. (1996)** HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 21: 289-296.
- Schnaith A., Leggio S. A., Addicks K., Kronke M. & Krut O. (2007)** *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *L. Biol. Chem.* 282: 2695-2706.
- Schramm A., De Beer D., Gieseke A. & Amann R. (2000)** Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. *Env. Microbiol.* 2(6): 680-686.
- Schröder A., Kland R., Peschel A., von Eiff C. & Aepfelbacher M. (2006)** Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med. Microbiol. Immun.* 195: 185-194.
- Schumann W., Hecker M. & Msadek T. (2002)** Regulation and function of heat-inducible genes in *Bacillus subtilis*. In *Bacillus subtilis* and its Closest Relatives: From Genes to Cells. Sonenshein A. L., Hoch J. A. & Losick R. M. (eds.) Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 359-368.
- Schweitzer C., Gercke C., Vanittanakom N., Mack D. & Götz F. (1996)** Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20: 1083-1091.
- Sendi P. & Proctor R. A. (2009)** *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol.* 17(2): 54-8.
- Senn M. M., Bischoff M., von Eiff C. & Berger-Bächi B. (2005a)**  $\sigma^B$  activity in a *Staphylococcus aureus* hemB mutant. *J Bacteriol* 187: 7397–7406.
- Senn M. M., Giachino P., Homerova D., Steinhuber A., Strassner J., Kormanec J., Fluckiger U., Berger-Bächi B. & Bischoff M. (2005b)** Molecular analysis and organization of the  $\sigma^B$  operon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187: 8006-8019.
- Shanks R. M. Q., Meehl M. A., Brothers K. M., Martinez R. M., Donegan M. P., Graber M. L., Cheung A. L. & O'Toole G. (2008)** Genetic Evidence for an Alternative Citrate-Dependent Biofilm Formation Pathway in *Staphylococcus aureus* That Is Dependent on Fibronectin Binding Proteins and the GraRS Two-Component Regulatory System *Infect. Immun.* 76(6): 2469-2477.



- Shompole S., Henon K. T., Liou L. E., Dziewanowska K., Bohach G. A. & Bayles K. W. (2003)** Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Mol. Microbiol.* 49: 919-927.
- Signas C., Raucci G., Jonsson K., Lindgren P. E., Anantharamaiah G. M., Höök M. & Lindberg M. (1989)** Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc. of the Nat. Ac. of Sci. of the USA.* 86(2): 699-703.
- Silvestri L. G. & Hill L. R. (1965)** Agreement between deoxyribonucleic acid base composition and taxometric classification of gram-positive cocci. *J. Bacteriol.* 90: 136-140.
- Sinha B. & Herrmann M. (2005)** Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb. Haemost.* 94: 266-277.
- Sinha B., Francois P. P., Nüße O., Foti M., Hartford O. M., Vaudaux P., Forster T. J., Lew D., Herrmann M. & Krause K.-H. (1999)** Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *Cell. Microbiol.* 1(2): 101-117.
- Sinha B. & Fraunholz M. (2010)** *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *J. Med. Microbiol.* 300: 70-175.
- Sinha B. & Fraunholz M. (2012)** Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Cell. Infect. Microbiol.* 2(43): 1-10.
- Somerville G. A., Chaussee M., Morgan C. I., Fitzgerald J. R., Dorward D. W., Reitzer L. J. & Musser J. M. (2002)** *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival. *Infect. Immun.* 70: 6373-82.
- Somerville G. A., Saïd-Salim B., Wickman J. M., Raffel S. J., Kreiswirth B. N. & Musser J. M. (2003)** Correlation of acetate catabolism and growth yield in *Staphylococcus aureus*: implications for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* 71: 4724-32.
- Steinberger R. E. & Holden P. E. (2005)** Extracellular DNA in Single- and Multiple-Species Unsaturated Biofilms. *Appl. Env. Microb.* 71(9): 5404-5410.
- Steinhuber A., Goerke C., Bayer M. G., Doring G. & Wolz C. (2003)** Molecular Architecture of the Regulatory Locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Expression of Virulence Factors. *J. Bacteriol.* 185(21): 6278-6286.
- Traber K. E., Lee E., Benson S., Corrigan R., Cantera M., Shopsis B. & Novick R. P. (2008)** *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. *Microbiol.* 154: 2265-2274.
- Tuazon, C. U., Perez, A., Kishaba, T., & Sheagren, J. N. (1975)** *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients. An increased carrier rate. *JAMA* 231: 1272.

- Tuazon C. U. & Sheagren J. N. (1974)** Increased rate of carriage of *Staphylococcus aureus* among narcotic addicts. J. Infect. Dis. 129: 725-727.
- Tuchscher I., Heitmann V., Hussain M., Viemann D., Roth J., von Eiff C., Peters G., Becker K. & Löffler B. (2010)** *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Adapted Phenotypes for Intracellular Persistence. J. Infect. Dis. 2010(202): 1031-1040.
- Tuchscher L., Medina E., Hussain M., Völker W., Heitmann V., Niemann S., Holzinger D., Roth J., Proctor R. A., Becker K., Peters G. & Löffler B. (2011)** *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. EMBO Mol. Med. 3: 129-141.
- Tucker K. A., Reilly S. S., Leslie C. S. & Hudson M. C. (2000)** Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts. FEMS Microbiol. Lett. 186: 151-156.
- Van Bogelen R. A., Acton M. A. & Neidhardt F. C. (1987)** Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*. Genes Dev 1: 525-531.
- Vanden Bergh M. F., Yzerman E. P., van Belkum H. A., Boelens H. A., Sijmons M. & Verbrugh H. A. (1999)** Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: Redefining the persistent carrier state. J. Clin. Microbiol. 37: 3133-3140.
- Vaudaux P., Francois P., Bisognano C., Kelley W. L., Lew D. P., Schrenzel J., Proctor R. A., McNamara P.J., Peters G. & von Eiff C. (2002)** Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. Infect. Immun. 70: 5428- 5437
- Versteeg S., Escher A., Wende A., Wiegert T. & Schumann W. (2003)** Regulation of the *Bacillus subtilis* heat shock gene *htpG* is under positive control. J. Bacteriol. 185: 466-474.
- von Eiff C., Becker K., Machka K., Stammer H. & Peters G. (2001)** Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. N. Engl. J. Med. 344(1): 11-6.
- von Eiff C., Becker D., Metze D., Lubritz G., Hockmann J., Schwarz T. & Peters G. (2001)** Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with darier's disease. Clin. Infect. Dis. 32: 1643-1647.
- von Eiff C., Bettin D., Proctor R. A., Rolauffs B., Lindner N., Winkelmann W. & Peters G. (1997a)** Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. Clin. Infect. Dis. 25: 1250-1251.
- von Eiff C., Heilmann C. & Peters G. (1999)** New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. Europ. J. Clin. Microbiol. & Infect. Dis. 18(12): 843-846.

- von Eiff C., Heilmann C., Proctor R. A., Woltz C., Peters G. & Götz F. (1997b)** A site-directed *Staphylococcus aureus* *hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. J. Bacteriol. 179: 4706-4712.
- Voyich J. M., Braughton K. R., Sturdevant D. E., Whitney A. R., Said-Salim B., Porcella S. F., Long R. D., Dorward D. W., Gardner D. J., Kreiswirth B. N., Musser J. M. & DeLeo F. R. (2005)** Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. J. Immun. 175(6): 3907-19.
- Vuong C., Gerke C., Somerville G. A., Fischer E. R. & Otto M. (2003)** Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis. 188: 706–718.
- Vuong C., Kidder J. B., Jacobson E. R., Otto M., Proctor R. A. & Somerville G. A. (2005)** *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin Production Significantly Increases during Tricarboxylic Acid Cycle Stress. J. Bacteriol. 187(9): 2967–2973.
- Vuong C. & Otto M. (2002)** *Staphylococcus epidermidis* infections. Microbes Infect. 4: 481–489.
- Watson S. P., Antonio M. & Foster S. J. (1998)** Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* starvation-induced, stationary-phase mutants defective in survival or recovery. Microbiol. 144: 3159-69.
- Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T. R., Fareed G. C. & Richardson C. C. (1968)** Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. J. Biol. Chem. 243(17): 4543-55.
- Weinstein H. J. (1959)** The relation between the nasal-staphylococcal-carrier state and the incidence of postoperative complications. N. Engl. J. Med. 260: 1303-1308.
- Welch W. J. (1993)** Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their role in normal and stressed cells. Philos. Trans. R. Soc. London B339: 327-333.
- Wenzel R. P. & Perl T. M. (1995)** The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. J. Hosp. Infect. 31: 13-24.
- Wesson C. A., Liou L. E., Todd K. M., Bohach G. A., Trumble W. R. & Bayles K. W. (1998)** *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. Infect. Immun. 66(11): 5238–5243.
- Wickner S., Maurizi M. R. & Gottesman S. (1999)** Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. Sci. Rev. 286: 1888-1893.
- Wozniak D. J., Tiwari K. B., Soufan R. & Jayaswal R. K. (2012)** The *mcsB* gene of the *clpC* operon is required for stress tolerance and virulence in *Staphylococcus aureus*. Microbiol. 158 (10): 2568-76.

- Wu S., de Lencastre H. & Tomasz A. (1996)** Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. J. Bacteriol. 178: 6036-6042.
- Yarwood J.M., Bartels D. J., Volper E. M. & Greenberg E. P. (2004)** Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. J. Bacteriol. 186(6): 1838–1850.
- Ye F., Zhang J., Liu H., Hilgenfeld R., Zhang R., Kong X., Li L., Lu J., Zhang X., Li D., Jiang H., Yang C. G. & Luo C. (2013)** Helix Unfolding/Refolding Characterizes the Functional Dynamics of *Staphylococcus aureus* Clp Protease. J. Biol. Chem. 288(24): 17643-53.
- Yoshizumi S., Zhang Y. Yamaguchi L., Chen L., Jreuswirth B. N. & Inouye M. (2009)** *Staphylococcus aureus* YoeB homologues inhibit translation initiation. J. Bacteriol. 191: 5868-5672.
- Yu V. L., Goetz A., Wagener M., Smith P. B., Rihs J. D., Hanchett J. & Zuravleff J. J. (1986)** *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. Efficacy of antibiotic prophylaxis. N. Engl. J. Med. 315: 91-96.
- Zhu Y., Xiong Y. Q., Sadykov M. R., Fey P. D., Lei M. G., Lee C. Y., Bayer A. S. & Somerville G. A. (2009)** Tricarboxilic Acid Cycle-Dependent Attenuation of *Staphylococcus aureus* In Vivo Virulence by Selective Inhibition of Amino Acid Transport. Inf. Immun. 77(10): 4256-4264.

# Kongressbeiträge/Posterpräsentationen

## Publizierter Abstract

**Melanie Finke, Stephanie Bur, Mathias Herrmann, Markus Bischoff**

Importance of *Staphylococcus aureus* ClpB and ClpC in intracellular persistence

International Journal of Medical Microbiology, Vol. 301 (Suppl no. 1), S. 72, 2011

zur 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM),  
Essen

## Posterpräsentation

110. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), 2012, Berlin

**Melanie Finke, Katharina Bleses, Katrin Winkler, Jiong Wang, Nóra Szentmáry, Timo Eppig,  
Hans-Jochen Foth, Dirk Hüttenberger, Achim Langenbacher, Berthold Seitz und  
Markus Bischoff**

Die photodynamische Therapie: Eine neue Perspektive für die Behandlung der bakteriell  
induzierten infektiösen Keratitis

## Danksagung

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Mathias Herrmann für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der großen Begeisterung für diese Arbeit und natürlich der Überlassung des interessanten Themas.

Herrn Prof. Dr. Thomas Tschernig für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Markus Bischoff für die vielen Anregungen und die Kritik, der unermüdlichen Diskussionsbereitschaft und selbstverständlich der Betreuung dieser Arbeit.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima, die stete Hilfs- und Gesprächsbereitschaft, aber auch für die gemeinsamen Stunden außerhalb der Laborzeit.

Dem gesamten Sekretariats-Team für ein stets offenes Ohr bei jeglichen Problemen und bürokratischen Angelegenheiten sowie die unkomplizierte und vor allem freundliche Hilfe.

Meinen Eltern, Helene, Thomas, Bettina und ganz besonders Jens für den Rückhalt, die viele Geduld, das Verständnis und die Motivation. Ich danke Euch einfach dafür, dass Ihr während der ganzen Zeit für mich da gewesen seid.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Melanie Finke  
Geburtsdatum, -ort: 15. Oktober 1983, Heilbronn/Neckargartach

## Studium/ Promotion:

2004 - 2009 Biologie-Studium an der  
Technischen Universität Kaiserslautern  
Akademischer Grad: Diplom-Biologin

2009 - 2012 Promotion am Institut für medizinische Mikrobiologie  
und Hygiene an dem Universitätsklinikum des  
Saarlandes, Homburg/Saar

## Weitere Tätigkeiten:

2003 - 2004 Freiwilliges Soziales Jahr bei der  
evangelischen Stadtmission, Bad Rappenau

## Schulbildung:

1990 - 1994 Grundschule Schwaigern  
1994 - 2000 Realschule Bad Rappenau  
2000 - 2003 Wirtschaftsgymnasium Sinsheim